Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. R.-E. Bader

Änderung der Empfindlichkeit des Hämagglutinationshemmungstests unter verschiedenen Versuchsbedingungen bei Verwendung von Influenza A2-Stämmen von verschiedener Avidität

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Eckart Schmid
aus Saulgau

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547609_0047

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. R.-E. Bader

Änderung der Empfindlichkeit des Hämagglutinationshemmungstests unter verschiedenen Versuchsbedingungen bei Verwendung von Influenza A2-Stämmen von verschiedener Avidität

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Eckart Schmid
aus Saulgau

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. K. Mörike

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. H.-J. Gerth

2. Berichterstatter: Professor Dr. R.-E. Bader

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 2

II. Methodik

1.) Materialien und Versuchsanordnung 4
2.) Reagenzien 11

III. Versuchsergebnisse

1.) Hämagglutinationshemmungstests mit Seren von einmal immunisierten NMRI-Mäusen 13
2.) Hämagglutinationshemmungstests mit Seren von mehrfach immunisierten NMRI-Mäusen 18
3.) Hämagglutinationshemmungstests mit Humanseren 23
4.) Vergleich der Routine-Hämagglutinationshemmungsreaktionen mit durch Kaliumperjodat und Neuraminidase inaktivierten Humanseren und der geänderten Versuchsmethode ... 43
5.) Das Zusammenwirken der geänderten Versuchsparameter auf die Titer der Hämagglutinationshemmungstests mit Humanseren 48
6.) Versuche mit Humanseren ohne nachweisbare Hämagglutinationshemmung 51
7.) Kontrollen 53

IV. Diskussion

1.) Methodik 54
2.) Der Einfluß der Erythrocytenart auf die Titer des Hämagglutinationshemmungstests 57
3.) Der Einfluß von Kofaktor auf die Titer des Hämagglutinationshemmungstests 59
4.) Der Einfluß der Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper auf die Titer des Hämagglutinationshemmungstests 64

V. Zusammenfassung 65

VI. Literaturverzeichnis 67

I. Einleitung

Die Ergebnisse des Hämagglutinationshemmungstests mit Influenza-Viren (J.E.SALK, 1948) hängen von einer Reihe von Versuchsparametern ab. Mit einem Teil der Influenza A_2-Stämme werden nur sehr niedrige Hemmtiter erzielt. Durch Modifikation der von der WHO empfohlenen Methode (E.H.LENNETTE und N.J.SCHMIDT, 1964) können die Titer erhöht werden.

In dieser Arbeit wurden für zwei Substämme unterschiedlicher Antikörperempfindlichkeit aus einem in Tübingen 1963 isolierten Influenza A_2-Stamm folgende Fragen zu klären versucht:

1.) Wie ändert sich der Titer der Hämagglutinationshemmungsreaktion, wenn statt Hühnererythrocyten Humanerythrocyten der Blutgruppe O verwendet werden? (G.I.ALEXANDROVA, 1959)

2.) Wie ändert sich der Titer, wenn an der Reaktion eine als Kofaktor (B.STYK et al., 1959) oder als unspezifischer thermolabiler Stimulator von Antikörpern (A.A.YABROV und A.A.SMORODINTSEV, 1962) bezeichnete Komponente normaler Tierseren beteiligt ist?

3.) Wie ändert sich der Titer, wenn die Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper verlängert wird? (G.I.ALEXANDROVA, 1959)

4.) Reagieren Mäusefrühimmunseren, -hyperimmunseren und Humanseren gleich auf die Änderung der Versuchsparameter?

5.) Können Unterschiede im Verhalten des gegen Antikörper und Inhibitoren empfindlichen und des gegen Antikörper und Inhibitoren unempfindlichen Antigens nachgewiesen werden?

6.) Lassen sich durch eine Kombination von Verlängerung der Bindungszeit, Wahl der optimalen Erythrocytenart und Kofaktorzusatz die Titer der Hämagglutinationshemmungsreaktion mit dem gegen Antikörper und Inhibitoren empfindlichen und dem gegen Antikörper und Inhibitoren unempfindlichen Stamm annähern?

II. Methodik

1.) Materialien und Versuchsanordnung

Antigen: Zwei Substämme des Antigens A_2/Tübingen/63 wurden verwendet.

Ein Stamm wurde durch wiederholtes Verimpfen von Endverdünnungen gewonnen. Dieser genetisch weitgehend reine Stamm wird als $A_2/Tüb/63^+$-Stamm (I^+-Stamm) bezeichnet. Er ist gegen Inhibitoren und Antikörper empfindlich.

Der unempfindliche Stamm $A_2/Tüb/63^-$ (I^--Stamm) wurde ursprünglich durch wiederholte Eipassagen mit Pferdeserum mit anschließenden Passagen über Endverdünnungen genetisch gereinigt (H.-J. GERTH, 1969).

Zur Antigengewinnung (E.H.LENNETTE und N.J.SCHMIDT, 1964) wurden befruchtete Hühnereier 10 Tage lang bei 37 °C bebrütet. Dann wurden 0,2 ml infektiöse Allantoisflüssigkeit früherer Eipassagen, die etwa 10^5 EID_{50} enthielt, in die Allantoishöhle des Embryos injiziert. Nach weiterer zweitägiger Bebrütung bei 37 °C wurden die Eier über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wurde die Allantoisflüssigkeit geerntet und deren Hämagglutinationstiter ermittelt. Die Antigensuspension wurde bis zum Gebrauch bei -70 °C eingefroren.

Seren:

1.) Frühimmunseren von NMRI-Mäusen:

Zur Gewinnung des ersten Serumpaars wurden je 10 NMRI - Mäuse im Gewicht von ungefähr 30 g einmal intranasal in leichter Äthernarkose mit 0,05 ml infektiöser Antigensuspension des I^+-Stamms oder des I^--Stamms mit einem Hämagglutinationstiter von 128 - 512 immunisiert. 10 Tage danach wurde das Blut der Mäuse durch Herzpunktion abgenommen. Zur Serumgewinnung wurde das Punktat von je einer Tiergruppe gemeinsam verarbeitet.

Das zweite und dritte Serumpaar wurde 14 Tage bzw. 21 Tage nach einmaliger intraperitonealer Impfung in leichter Äthernarkose mit 0,05 ml infektiöser Antigensuspension des I^+- und des I^--Antigens mit einem Hämagglutinationstiter von 128 - 512 auf gleiche Weise hergestellt.

2.) Hyperimmunseren von NMRI-Mäusen:

Die zwei Spätimmunserumpaare stammten von NMRI - Mäusen, die dreimal im Abstand von je einer Woche auf gleiche Weise wie oben beschrieben intranasal bzw. intraperitoneal immunisiert worden waren und deren Seren 14 Tage nach der letzten Antigengabe gewonnen wurden.

Die Tierseren wurden bis zur Verwendung bei -20 ^{0}C in kleinen Mengen gelagert.

3.) Humanseren:

Die Seren wurden aus Sammlungen des Hygieneinstituts Tübingen ausgewählt und bestanden aus Proben, die für serologische Untersuchungen - hauptsächlich zur Lues - Diagnostik - eingesandt worden waren. Sie wurden ebenfalls bei -20 °C in der Tiefkühltruhe in kleinen Portionen aufbewahrt.

Kofaktor (B.STYK et al., 1959) oder unspezifischer thermolabiler Stimulator von Antikörpern (A.A.YABROV und A.A.SMORODINTSEV, 1962)

Als Kofaktor diente Normalserum von NMRI-Mäusen, ohne Rücksicht auf deren Alter und Geschlecht. Das Normalserum wurde bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt und war bei Verwendung nicht älter als 14 Tage.

Kofaktor wurde nach Adsorption an Hühner- bzw. Humanerythrocyten teils 25%ig, teils 12,5%ig in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung in den Versuchen benutzt.

Erythrocyten:

1.) Hühnererythrocyten:

Das Blut weißer Leghornhybriden wurde mit 15% Citrat - Dextroselösung aus einer Flügelvene entnommen. Die roten Blutkörperchen wurden durch dreimaliges Waschen in dreifacher Menge phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung in der Zentrifuge bei etwa 6 g gewonnen und unter

Dextrose-Gelatine-Veronal-Puffer konserviert und 24 - 96 Stunden nach Entnahme verwendet.

2.) Humanerythrocyten:

Humanerythrocyten der Blutgruppe O stammten aus Konserven der Blutbank der Tübinger Chirurgischen Klinik und wurden in gleicher Weise wie die Hühnererythrocyten aufbereitet und aufbewahrt.

Seruminaktivierung:

1.) Inaktivierung mit Neuraminidase oder Receptor Destroying Enzyme (RDE) (F.M.BURNET und J.D.STONE, 1947)

Für 2 ml Serum der Verdünnung 1:8 wurden 0,25 ml Serum mit 0.5 ml 10%igem Enzym in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Zu dieser Lösung wurden 0,2 ml Antibiotikalösung in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung gegeben. Nach Hinzufügung von 1,05 ml phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung wurde der Ansatz 14 - 16 Stunden bei 37 ^{0}C im Brutschrank inkubiert und danach 30 Minuten bei 56 ^{0}C im Wasserbad hitzeinaktiviert. Die Seren wurden dann bis zum Gebrauch, der innerhalb von 72 Stunden erfolgte, bei +4 ^{0}C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.) Inaktivierung mit KJO_4
(WHO Technical Report, 1959)

Zur Ansatzverdünnung der Seren von 1:8 wurde 1 Teil Serum mit 3 Teilen m/90 KJO_4-Lösung in doppelt destilliertem Wasser unter Schütteln gemischt. Nach 15-minütigem Stehen dieses Ansatzes bei Zimmertemperatur wurde 1 Teil 1%ige Glycerinlösung in doppelt destilliertem Wasser zugegeben und die Mischung nach nochmaligem 15-minütigem Stehen bei Zimmertemperatur 30 Minuten lang im Wasserbad bei 56 ^{0}C inaktiviert.

Hämagglutinationshemmungstest (J.E.SALK, 1948; E.H.LENNETTE und N.J.SCHMIDT, 1964)

Die Seren wurden mit Hilfe der Mikromethode (G.TAKÁTSY, 1955; J.L.SEVER, 1962) getestet.

Das Mikrotitersystem besteht aus

1.) Plexiglasplatten mit 8×12 Vertiefungen, deren Böden zur Erleichterung der Erythrocytensedimentation konisch zulaufen;
2.) Spezialtropfern aus Kunststoff mit Metallenden mit einem bei senkrechter Haltung konstanten Tropfenvolumen von 0,05 oder 0,025 ml;
3.) Verdünnern aus Metall, deren Arbeitsende 0,05 bzw. 0,025 ml aufnimmt und die zur Anfertigung geometrischer Verdünnungsreihen geeignet sind.

Technische Durchführung:

0,025 ml Serum wurden in zweifachen Stufen in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung bzw. in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung mit Kofaktorzusatz verdünnt. Anschließend wurden in jede Vertiefung 0,025 ml Antigensuspension gegeben, die 4 hämagglutinierende Einheiten Antigen enthielt.

Nach halbstündiger Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper bei Zimmertemperatur oder bei ca. 16-stündiger Inkubation von Antigen und Antikörper bei 4 °C im Kühlschrank wurden in jede Vertiefung 0,05 ml einer 0,5%igen Erythrocytensuspension in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung getropft.

Nach ungefähr einer Stunde wurde nach dem üblichen Mustersystem, wie aus untenstehender Abbildung ersichtlich ist, der Hämagglutinationshemmungstiter der Seren als die höchste Verdünnungsstufe ermittelt, bei der die Hämagglutination noch vollständig gehemmt wurde.

Abb. 1:
Muster von 12 Hämagglutinationshemmungsversuchen auf einer Plexiglasplatte des Mikrotitersystems

Vor jedem Hämagglutinationshemmungstest wurde das Antigen mit Hilfe des Hämagglutinationstests (G.K.HIRST, 1941; E.H.LENNETTE und N.J.SCHMIDT, 1964) titriert. Dazu wurden 0,05 ml antigenhaltige Allantoisflüssigkeit in zweifachen Stufen in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Dann wurden zu jeder Antigenverdünnung 0,05 ml einer 0,5%igen Erythrocytensuspension hinzugefügt und nach ungefähr einer Stunde der Hämagglutinationstiter als die höchste Antigenverdünnungsstufe ermittelt, bei der noch alle Erythrocyten agglutiniert waren.
Durch Mischen der Allantoisflüssigkeit mit phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung wurde das Antigen auf den Hämagglutinationstiter 1:8 eingestellt, so daß in 0,025 ml Suspension 4 hämagglutinierende Einheiten vorhanden waren (Abb. 2).

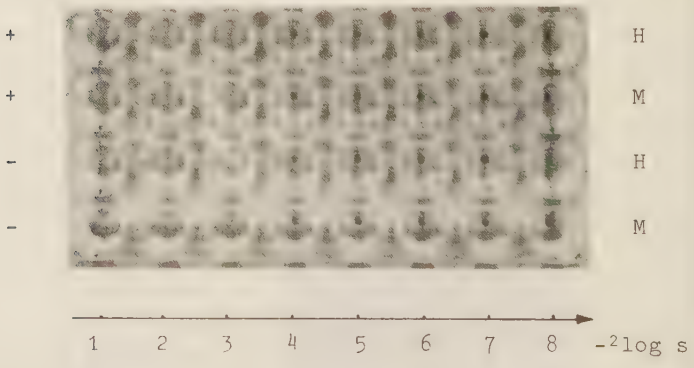


Abb.2: Muster von 4 Hämagglutinationstests mit einer auf den Titer 1:8 eingestellten Antigensuspension

H: Hühnererythrocyten +: Influenza A_2/Tüb/63$^+$
M: Menschenerythrocyten -: Influenza A_2/Tüb/63$^-$
s: Serumverdünnung

2. Reagenzien

1.) Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung

Dieser Puffer wurde nach folgendem Rezept hergestellt:

85,00g NaCl
14,23g Na_2HPO_4
und 1,35g KH_2PO_4

wurden mit destilliertem Wasser auf 10 l aufgefüllt und 10 min autoklaviert.

2.) Citrat - Dextrose - Lösung

11,26g Natriumcitrat
4,00g Citronensäure
und 11,00g Dextrose

wurden mit destilliertem Wasser zu 500 ml aufgefüllt und die Lösung 10 min autoklaviert.

3.) Dextrose - Gelatine - Veronal - Lösung

Diese Lösung enthält

0,58g Veronal
0,60g Gelatine
0,38g Natrium - Veronal
0,02g $CaCl_2$
0,12g $MgSo_4$ 7 H_2O
8,50g NaCl
und 10,00g Dextrose

Veronal und Gelatine wurden unter Erhitzen in 250 ml destilliertem Wasser gelöst. Der Ansatz wurde bei Zimmertemperatur mit den übrigen ebenfalls in destilliertem Wasser gelösten Substanzen gemischt, mit destilliertem Wasser zu 1 l aufgefüllt und 10 min autoklaviert. Der pH - Wert der Lösung lag zwischen 7,0 und 7,6.

4.) Neuraminidase oder
Receptor Destroying Enzyme
aus Choleravibrionenkulturen:

Das Enzym wurde von den BEHRING - Werken (Marburg) bezogen. 1 ml enthält 500 Einheiten. (Eine Einheit ist definiert als diejenige Enzymmenge, die 1 µg N-Acetylneuraminsäure in 15 min bei 37 ^{0}C in 0,05 M Natriumacetatessigsäure - Puffer mit einem pH von 5,5 aus saurem α_1-Glykoprotein abspaltet.)

5.) Antibiotikalösung:

Die bei der Seruminaktivierung mit Neuraminidase verwendete Antibiotikalösung enthielt auf 1 ml phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung 500 IE Penicillin und 500 µg Streptomycin.

III. Versuchsergebnisse

1.) Hämagglutinationshemmungstests mit Seren von einmal immunisierten NMRI-Mäusen

An drei Frühimmunserumpaaren von NMRI - Mäusen, von denen jeweils eine Gruppe mit Influenza A_2/Tüb/63$^+$ und eine mit A_2/Tüb/63$^-$ immunisiert war, wurde die Auswirkung der veränderten Versuchsparameter geprüft:

Jedes Serum wurde auf Antikörper gegen den I^+-Stamm und den I^--Stamm getestet; dabei wurden sowohl Hühner- wie Humanerythrocyten verwendet; weiter wurden Antigen und Antikörper vor Zugabe der roten Blutkörperchen eine halbe Stunde bzw. ungefähr 16 Stunden inkubiert, und jeder Versuch wurde ohne bzw. mit Zusatz von Kofaktor angesetzt. Auf diese Weise entstanden für jedes Serum 16 Paralleltestreihen.

Die folgenden Tabellen 1a, 1b und 1c stellen die Zweierlogarithmen der reziproken Titer der solchermaßen durchgeführten Hämagglutinationshemmungsversuche dar.

Tabelle 1a

Hämagglutinationshemmungstest mit Mäusefrühimmunseren

Zeitp. d. Blutentnahme nach der Infektion			10 Tage		10 Tage	
Zur Immunisierung verw. Antigen			$A_2/Tüb/63^+$		$A_2/Tüb/63^-$	
Bindungszeit zw. Antigen u. Antikörper			1/2h	16h	1/2h	16h
	EA	AG				
Titer ohne Kofaktor	H	+	4	5	3	4
	M	+	4	5	3	4
	H	-	<3	<3	<3	<3
	M	-	<3	<3	<3	<3
Titer mit Kofaktor	H	+	7	8	7	8
	M	+	7	8	7	8
	H	-	<3	<3	<3	<3
	M	-	<3	<3	<3	<3

EA: Erythrocytenart
AG: Antigenstamm
H: Hühnererythrocyten
M: Menschenerythrocyten

+: Influenza $A_2/Tüb/63^+$
-: Influenza $A_2/Tüb/63^-$

Tabelle 1b

Hämagglutinationshemmungstest mit Mäusefrühimmunseren

Zeitp. d. Blutentnahme nach der Infektion			14 Tage		14 Tage	
Zur Immunisierung verw. Antigen			$A_2'/Tüb/63^+$		$A_2/Tüb/63^-$	
Bindungszeit zw. Antigen u. Antikörper			1/2h	16h	1/2h	16h
	EA	AG				
Titer ohne Kofaktor	H	+	5	6	4	5
	M	+	5	6	4	5
	H	-	<3	<3	3	5
	M	-	<3	<3	3	5
Titer mit Kofaktor	H	+	7	8	6	7
	M	+	7	8	6	7
	H	-	<3	<3	5	7
	M	-	<3	<3	5	7

EA: Erythrocytenart
AG: Antigenstamm
H: Hühnererythrocyten
M: Menschenerythrocyten

+: Influenza $A_2/Tüb/63^+$
-: Influenza $A_2/Tüb/63^-$

Tabelle 1c

Hämagglutinationshemmungstest mit Mäusefrühimmunseren

Zeitp. d. Blutentnahme nach der Infektion			21 Tage		21 Tage	
Zur Immunisierung verw. Antigen			A_2/Tüb/63$^+$		A_2/Tüb/63$^-$	
Bindungszeit zw. Antigen u. Antikörper			1/2h	16h	1/2h	16h
	EA	AG				
Titer ohne Kofaktor	H	+	5	6	5	6
	M	+	5	6	5	6
	H	-	<3	<3	4	5
	M	-	<3	<3	4	5
Titer mit Kofaktor	H	+	7	8	7	8
	M	+	7	8	7	8
	H	-	<3	<3	6	7
	M	-	<3	<3	6	7

EA: Erythrocytenart
AG: Antigenstamm
H: Hühnererythrocyten
M: Menschenerythrocyten

+: Influenza A_2/Tüb/63$^+$
-: Influenza A_2/Tüb/63$^-$

Auswertung von Tabelle 1:

1.) Der Einfluß der Erythrocytenart:

Die Verwendung von Humanerythrocyten der Blutgruppe O führte bei halbstündiger und ca. 16-stündiger Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper ohne oder mit Kofaktorzusatz zu den gleichen Titern wie der Gebrauch von Hühnererythrocyten. Dies galt für den I^+- und den I^--Stamm.

2.) Der Einfluß von Kofaktor:

Die Titer erhöhten sich durch die Wirkung von normalem Mäuseserum beim I^+-Stamm um 2 - 4 Stufen, im Mittel um 2,5 Stufen, wobei 1 Stufe der Faktor 2 oder eine Titererhöhung um 100% ist.

Bei Verwendung des I^--Stamms ließen 4 Seren keine Hämagglutinationshemmung erkennen. Werden nur die zwei Seren mit positiven Ergebnissen berücksichtigt, so stieg der Titer, ähnlich wie beim anderen Antigen, durchschnittlich um 2,75 Stufen.

Bei keinem Serum trat durch Kofaktorzusatz Hämagglutinationshemmung auf, wo sie ohne seine Anwesenheit nicht nachzuweisen war.

3.) Der Einfluß der Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper:

Die Titer erhöhten sich durch die auf etwa 16 Stunden verlängerte Inkubation von Antigen und Antikörper in allen Fällen mit nachweisbarer Hämagglutinationshemmung um 100%.

Negative Ergebnisse bei halbstündiger Bindungszeit blieben auch nach verlängerter Inkubation der Platten gleich.

2.) Hämagglutinationshemmungstests mit Seren von mehrfach immunisierten NMRI-Mäusen

Nach demselben Muster wie die Mäusefrühimmunseren wurden zwei Paare von Spätimmunseren untersucht, um die Auswirkung der veränderten Versuchsparameter auf späte Antikörper festzustellen.

Die Seren können nicht als Hyperimmunseren bezeichnet werden, weil zur Gewinnung solcher Seren die Tiere noch häufiger infiziert werden müssen.

Das erste Serumpaar wurde durch wiederholte intranasale, das zweite durch dreimalige intraperitoneale Impfung je einer Gruppe von Mäusen mit Influenza A_2/Tüb/63$^+$ und A_2/Tüb/63$^-$ erzeugt.

Die Tabellen 2a und 2b stellen die Zweierlogarithmen der reziproken Titer der Hämagglutinationshemmungsversuche mit Mäusespätimmunseren dar, die wie die Mäusefrühimmunseren unter 16 verschiedenen Versuchsbedingungen getestet wurden.

Tabelle 2a

Hämagglutinationshemmungstest mit Mäusespätimmunseren

Art der Immunisierung			intranasal		intranasal	
Zur Immunisierung verw. Antigen			A'_2/Tüb/63$^+$		A_2/Tüb/63$^-$	
Bindungszeit zw. Antigen u. Antikörper			1/2h	16h	1/2h	16h
	EA	AG				
Titer ohne Kofaktor	H	+	5	6	5	6
	M	+	5	6	5	6
	H	-	<3	<3	4	5
	M	-	<3	<3	4	5
Titer mit Kofaktor	H	+	7	8	6	7
	M	+	7	8	6	7
	H	-	4	5	5	6
	M	-	4	5	5	6

EA: Erythrocytenart
AG: Antigenstamm
H: Hühnererythrocyten
M: Menschenerythrocyten

+: Influenza A_2/Tüb/63$^+$
-: Influenza A_2/Tüb/63$^-$

Tabelle 2b

Hämagglutinationshemmungstest mit Mäusespätimmunseren

Art der Immunisierung			intra-peritoneal		intra-peritoneal	
Zur Immunisierung verw. Antigen			$A_2/Tüb/63^+$		$A_2/Tüb/63^-$	
Bindungszeit zw. Antigen u. Antikörper			1/2h	16h	1/2h	16h
	EA	AG				
Titer ohne Kofaktor	H	+	7	8	6	7
	M	+	7	8	6	7
	H	-	5	6	5	6
	M	-	5	6	5	6
Titer mit Kofaktor	H	+	8	9	7	8
	M	+	8	9	7	8
	H	-	6	7	6	7
	M	-	6	7	6	7

EA: Erythrocytenart
AG: Antigenstamm
H: Hühnererythrocyten
M: Menschenerythrocyten

+: Influenza $A_2/Tüb/63^+$
.: Influenza $A_2/Tüb/63^-$

Auswertung von Tabelle 2:

1.) Der Einfluß der Erythrocytenart:

Die Agglutination der Hühnererythrocyten wurde in allen Fällen bis zur selben Serumverdünnung gehemmt wie die der Humanerythrocyten.

2.) Der Einfluß von Kofaktor:

Kofaktor bewirkte für den I^+-Stamm einen Titeranstieg um 1 - 2 Stufen, im Mittel um 1,25 Stufen. Gegen Influenza A_2/Tüb/63$^-$ wurden in einem Serum ohne Kofaktorzusatz keine hämagglutinationshemmenden Substanzen gefunden; durch die Teilnahme von Kofaktor am Versuch stieg der Titer auf 1:16 bei halbstündiger Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper und auf 1:32 bei einer Inkubation von etwa 16 Stunden. Der mittlere Titeranstieg für den I^--Stamm betrug 1,8 Stufen, wenn anstelle der negativen Ergebnisse der Titer 1:2 eingesetzt wird; er unterscheidet sich damit nicht auffällig vom I^+-Stamm.

3.) Der Einfluß der Bindungszeit:

Die auf ungefähr 16 Stunden verlängerte Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper ließ den Titer für beide Testantigene jeweils um eine Stufe ansteigen. Im ersten Serum

wurden jedoch auch nach der größeren Zeitspanne der Inkubation von Antigen und Antikörper keine hämagglutinationshemmenden Substanzen gefunden.

Vergleich der Wirkung von Kofaktor auf Früh- und Spätimmunseren:

In dem Frühimmunserum, das 10 Tage nach einmaliger intranasaler Beimpfung der Mäuse mit dem I^+-Antigen gewonnen wurde, stieg der Titer bei Kofaktorzusatz gegen den I^+-Stamm um 3 Stufen an, sowohl bei halbstündiger wie auch bei 16-stündiger Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper; gegen das I^--Antigen wurde die Hämagglutination auch bei Kofaktorzusatz nicht gehemmt.

Im entsprechenden, mit dem I^--Antigen gewonnenen Frühimmunserum stieg der Titer gegen das I^+-Antigen um 4 Stufen an; gegen den I^--Stamm war in diesem Serum auch bei Kofaktorzusatz keine Hämagglutinationshemmung zu beobachten.

Die Titer der beiden Seren der mehrfach intraperitoneal immunisierten NMRI-Mäuse stiegen gegen beide Antigenarten in allen Fällen nur um 1 Stufe an.

Die Titer der übrigen Seren und die Titeranstiege bei Kofaktorzusatz lagen zwischen den oben angegebenen.

Die Titer gegen den I^+-Stamm und den I^--Stamm erreichten durch Kofaktorzusatz nicht dieselbe Höhe.

3.) Hämagglutinationshemmungstests mit Humanseren

In diesem Abschnitt sind zur besseren Verdeutlichung der Titeranstiege nur die Ergebnisse von Hämagglutinationshemmungstests mit menschlichen Seren zusammengestellt, bei denen entweder schon mit der Routinemethode oder durch Änderung eines oder mehrerer Versuchsparameter Hämagglutinationshemmung nachgewiesen werden konnte.

Auf Versuche ohne erkennbare Hämagglutinationshemmung wird unten eingegangen.

Die Humanseren wurden wie die Mäuseimmunseren auf Antikörper gegen Influenza $A_2/Tüb/63^+$ und $A_2/Tüb/63^-$ mit Hühner- und Humanerythrocyten, bei halbstündiger und ungefähr 16-stündiger Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper und ohne bzw. mit Kofaktoreinfluß getestet.

Abbildung 3 zeigt eine Plexiglasplatte, auf der mit dem Serum eines 12-jährigen der Hämagglutinationshemmungstest in der oben beschriebenen Weise ausgeführt wurde; die erste Vertiefung jeder Reihe enthält eine Kontrolle, in der das Serum - wie später angegeben - auf unspezifische Inhibitoren untersucht wurde.

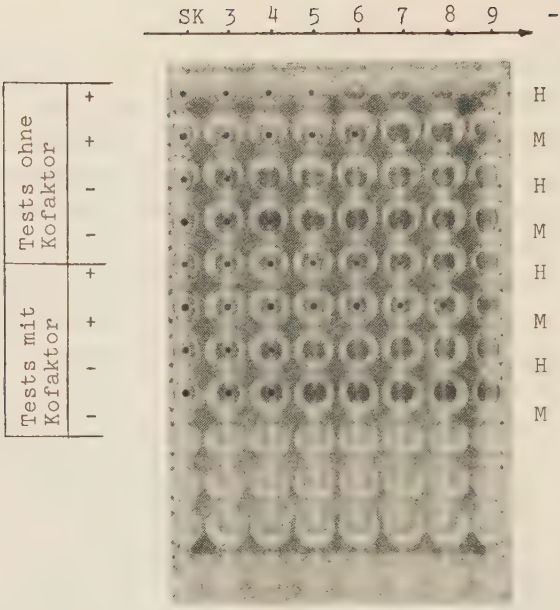


Abb. 3: Hämagglutinationshemmungsversuche mit dem Serum eines Zwölfjährigen, ausgeführt mit dem Mikrotitersystem bei halbstündiger Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper

SK: Serumkontrolle H: Hühnererythrocyten
s: Serumverdünnung M: Menschenerythrocyten

Tabelle 3 stellt die Zweierlogarithmen der reziproken Titer der Hämagglutinationshemmungsversuche mit Humanseren dar, die in der aus Abb. 3 ersichtlichen Weise bei halbstündiger Bindungszeit und ungefähr 16-stündiger Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper untersucht wurden.

Tabelle 3a

Hämagglutinationshemmungstest mit Humanseren

	Alter des Serumspenders		73 J		58 J		58 J		57 J		57 J	
	EA	AG t	1/2	16	1/2	16	1/2	16	1/?	16	1/2	16
Titer ohne Kofaktor	H	+	<3	<3	3	5	3	5	3	4	3	4
	M	+	<3	3	4	6	4	6	4	5	4	5
	H	-	<3	<3	<3	<3	<3	<3	3	4	<3	4
	M	-	<3	3	<3	4	<3	4	4	5	3	5
iter mit Kofaktor	H	+	<3	4	5	7	5	7	4	6	4	6
	M	+	5	6	6	8	6	8	5	7	5	7
	H	-	<3	4	<3	<3	<3	<3	3	5	3	4
	M	-	<3	5	3	5	3	5	4	6	4	6

EA: Erythrocytenart — H: Hühnererythrocyten

AG: Antigenstamm — M: Menschenerythrocyten

t: Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper in Stunden — +: Influenza A_2/Tüb/63$^+$ — -: Influenza A_2/Tüb/63$^-$

Tabelle 3b

Hämagglutinationshemmungstest mit Humanseren

	Alter des Serumspenders		56 J		52 J		52 J		51 J		51 J	
	EA	AG \ t	1/2	16	1/2	16	1/2	16	1/2	16	1/2	16
Titer ohne Kofaktor	H	+	3	4	4	4	4	5	<3	4	<3	4
	M	+	4	5	5	5	5	5	3	5	3	5
	H	-	<3	4	<3	3	3	3	<3	<3	<3	<3
	M	-	3	4	4	5	4	4	<3	<3	<3	<3
Titer mit Kofaktor	H	+	4	6	5	6	5	6	<3	4	<3	4
	M	+	5	7	6	6	6	6	3	5	4	5
	H	-	3	5	<3	4	3	4	<3	<3	<3	<3
	M	-	4	6	4	5	4	5	<3	<3	<3	<3

EA: Erythrocytenart — H: Hühnererythrocyten

AG: Antigenstamm — M: Menschenerythrocyten

t: Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper in Stunden — +: Influenza A_2/Tüb/63$^+$ — -: Influenza A_2/Tüb/63$^-$

Tabelle 3c

Hämagglutinationshemmungstest mit Humanseren

	Alter des Serumspenders		25 J		20 J		18 J		16 J		15 J	
	EA	AG \ t	1/2	16	1/2	16	1/2	16	1/2	16	1/2	16
Titer ohne Kofaktor	H	+	6	7	5	6	4	6	5	7	4	6
	M	+	6	8	6	7	5	7	5	7	5	7
	H	-	5	6	3	4	4	5	4	6	3	5
	M	-	6	8	4	4	5	6	5	7	4	5
Titer mit Kofaktor	H	+	8	8	6	8	6	7	6	8	5	7
	M	+	8	9	7	9	7	8	6	9	6	8
	H	-	6	7	4	5	5	6	5	7	4	5
	M	-	7	8	5	5	6	7	6	8	5	6

EA: Erythrocytenart
AG: Antigenstamm
t: Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper in Stunden

H: Hühnererythrocyten
M: Menschenerythrocyten
+: Influenza A_2/Tüb/63$^+$
-: Influenza A_2/Tüb/63$^-$

Tabelle 3d

Hämagglutinationshemmungstest mit Humanseren

	Alter des Serumspenders		14 J		14 J		13 J		12 J		10 J	
	EA	AG \ t	1/2	16	1/2	16	1/2	16	1/2	16	1/2	16
Titer ohne Kofaktor	H	+	3	4	3	5	4	5	5	6	3	4
	M	+	4	5	4	6	5	6	6	7	4	5
	H	-	<3	<3	<3	3	<3	3	3	4	<3	3
	M	-	<3	<3	3	4	4	4	4	5	3	3
Titer mit Kofaktor	H	+	5	5	4	5	5	6	7	8	4	5
	M	+	6	7	5	6	6	7	8	9	5	6
	H	-	<3	<3	3	4	3	4	4	6	3	4
	M	-	<3	<3	4	5	4	5	5	7	4	4

EA: Erythrocytenart

AG: Antigenstamm

t: Bindungszeit zw. Antigen

H: Hühnererythrocyten

M: Menschenerythrocyten

+: Influenza A-/Tüb/63+

Tabelle 3e

Hämagglutinationshemmungstest mit Humanseren

	Alter des Serumspenders		7 J		6 J		5 J		3 J		0 J	
	EA	AG / t	1/2	16	1/2	16	1/2	16	1/2	16	1/2	16
Titer ohne Kofaktor	H	+	3	5	4	5	<3	3	4	5	3	4
	M	+	4	6	5	6	3	4	5	6	4	5
	H	-	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	3
	M	-	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	3	4
Titer mit Kofaktor	H	+	4	6	5	6	3	4	5	6	4	5
	M	+	5	6	6	7	4	5	6	7	5	6
	H	-	<3	<3	<3	3	<3	<3	<3	<3	<3	3
	M	-	<3	<3	<3	3	<3	<3	<3	<3	4	4

EA: Erythrocytenart
AG: Antigenstamm
t: Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper in Stunden

H: Hühnererythrocyten
M: Menschenerythrocyten
+: Influenza A_2/Tüb/63^+
-: Influenza A_2/Tüb/63^-

Auswertung von Tabelle 3:

Diese Hämagglutinationshemmungstests mit Humanseren zeigten im allgemeinen folgende Resultate:

1.) Der Gebrauch von Humanerythrocyten führte bei vielen Seren zu höheren Titern als die Verwendung von Hühnererythrocyten.
2.) Kofaktorzusatz erhöhte die Titer ebenfalls in vielen Fällen.
3.) Eine längere Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper erbrachte bei vielen Versuchen einen Titeranstieg.
4.) Die höchsten Titer im Hämagglutinationshemmungstest wurden durch das Zusammenwirken dieser Versuchskomponenten erzielt.
5.) Ein auffälliger Unterschied im Verhalten der beiden Antigenstämme konnte nicht festgestellt werden.

Die einzelnen Titeranstiege werden mit Hilfe von Schaubildern dargestellt, in denen auf der Abszisse der Zweierlogarithmus des reziproken Titers des Hämagglutinationshemmungstests mit einem bestimmten Versuchsparameter der Routinemethode und auf der Ordinate die entsprechende Größe mit geändertem Parameter aufgetragen sind. Die Zahl neben den Koordinatenpunkten ist die Anzahl der Seren, die in den Paralleltests dieses Titerpaar aufwiesen.

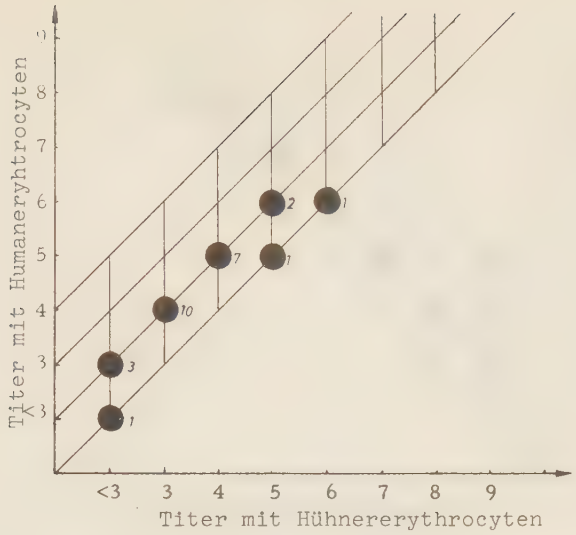


Schaubild 1: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter mit Hühner- und Humanerythrocyten für Influenza A_2/Tüb 63$^+$ bei halbstünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper, ohne Kofaktorzusatz

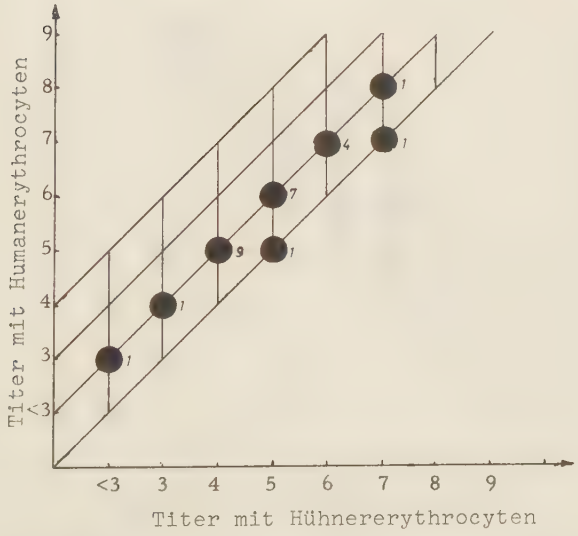


Schaubild 2: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter mit Hühner- und Humanerythrocyten für Influenza A_2/Tüb/63$^+$ bei 16-stünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper, ohne Kofaktorzusatz

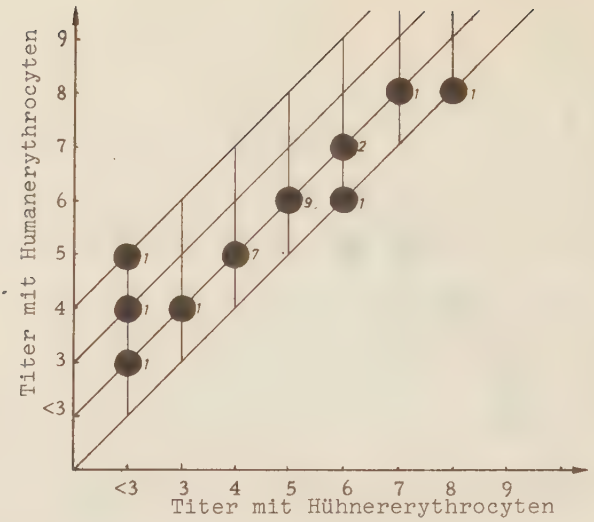


Schaubild 3: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter mit Hühner- und Humanerythrocyten für Influenza A_2/Tüb/63$^+$ bei halbstünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper, mit Kofaktorzusatz

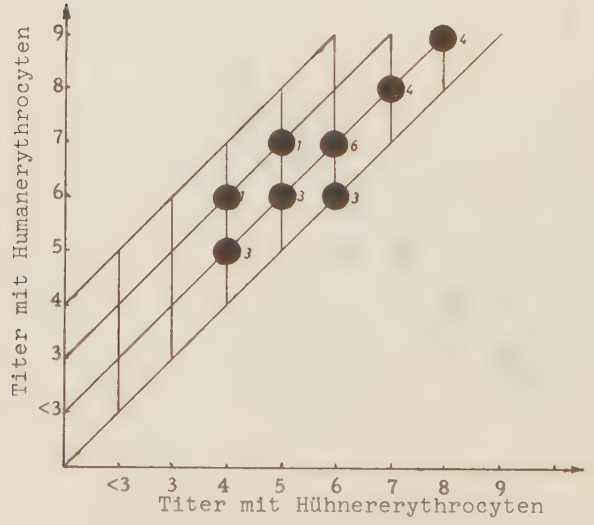


Schaubild 4: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter mit Hühner- und Humanerythrocyten für Influenza A_2/Tüb/63$^+$ bei 16-stünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper, mit Kofaktorzusatz

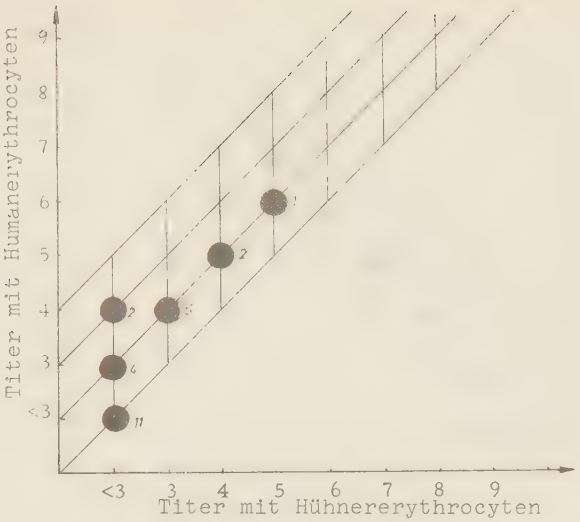


Schaubild 5: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter mit Hühner- und Humanerythrocyten für Influenza A_2/Tüb/63 bei halbstünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper, ohne Kofaktorzusatz

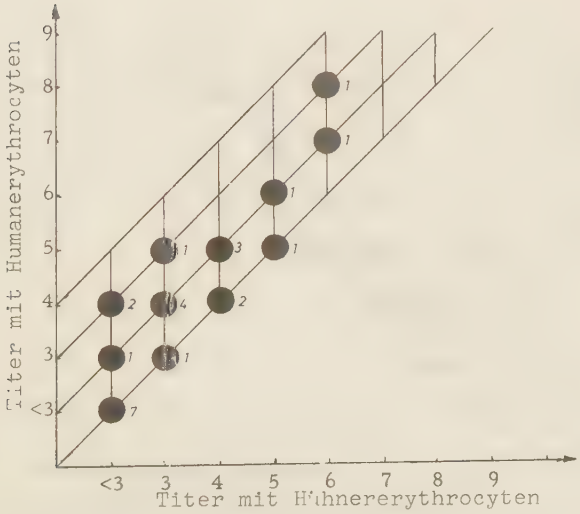


Schaubild 6: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter mit Hühner- und Humanerythrocyten für Influenza A_2/Tüb/63 bei 16-stünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper, ohne Kofaktorzusatz

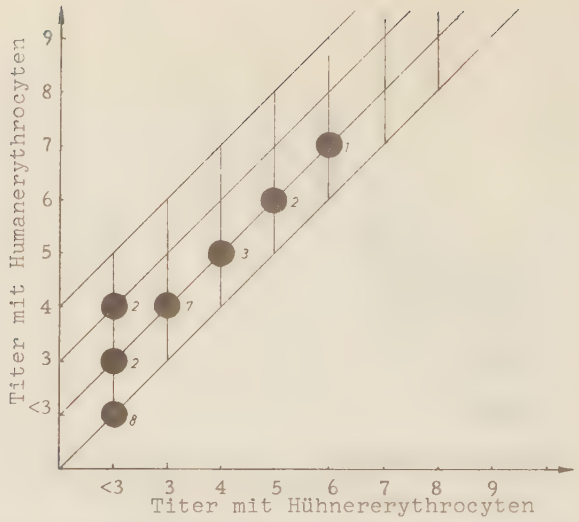


Schaubild 7: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter mit Hühner- und Humanerythrocyten für Influenza A_2/Tüb/63⁻ bei halbstünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper, mit Kofaktorzusatz

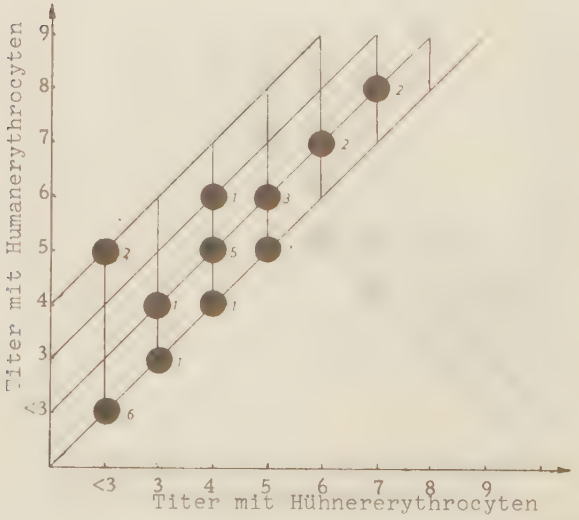


Schaubild 8: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter mit Hühner- und Humanerythrocyten für Influenza A_2/Tüb/63⁻ bei 16-stünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper, mit Kofaktorzusatz

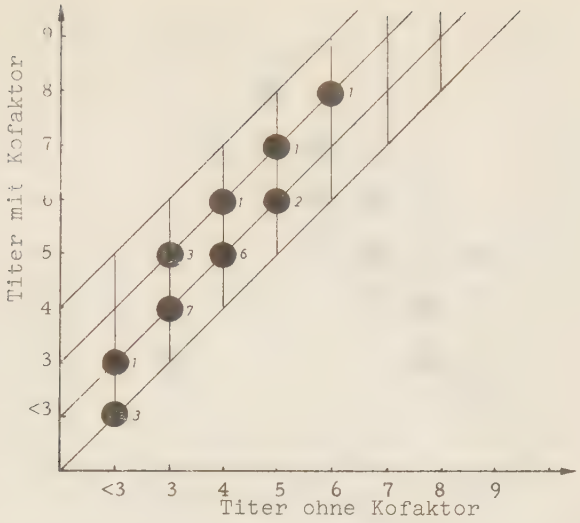


Schaubild 9: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter ohne bzw. mit Kofaktorzusatz für Influenza A_2/Tüb/63$^+$ bei halbstünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper und Verwendung von Hühnererythrocyten

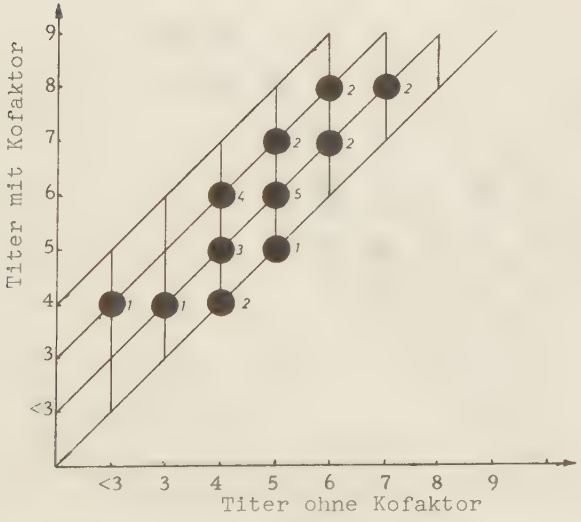


Schaubild 10: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter ohne bzw. mit Kofaktorzusatz für Influenza A_2/Tüb/63$^+$ bei 16-stünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper und Verwendung von Hühnererythrocyten

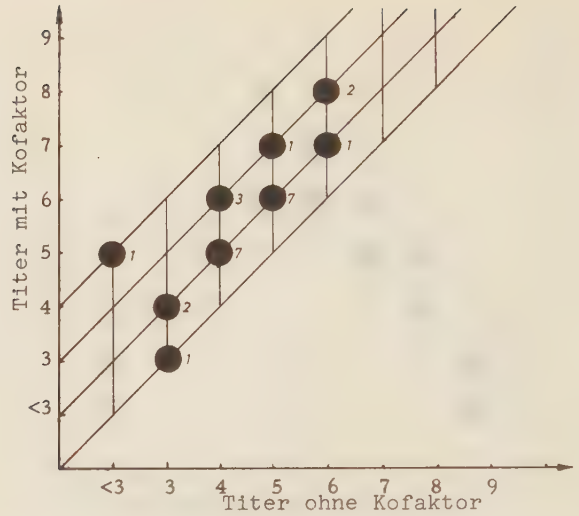


Schaubild 11: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter ohne bzw. mit Kofaktorzusatz für Influenza A_2/Tüb/6 bei halbstünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikör und Verwendung von Humanerythrocyten

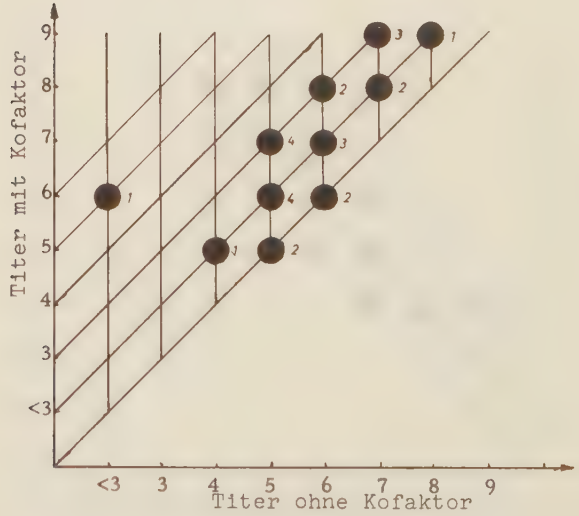


Schaubild 12: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter ohne bzw. mit Kofaktorzusatz für Influenza A_2/Tüb/ bei 16-stünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikör und Verwendung von Humanerythrocyten

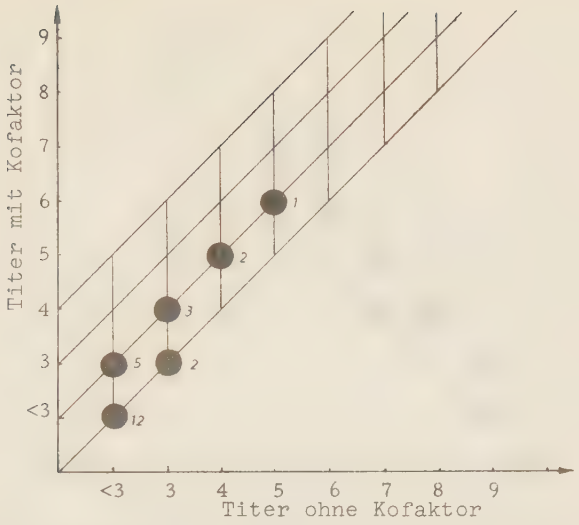


Schaubild 13: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter ohne bzw. mit Kofaktorzusatz für Influenza A_2/Tüb/63$^-$ bei halbstünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper und Verwendung von Hühnererythrocyten

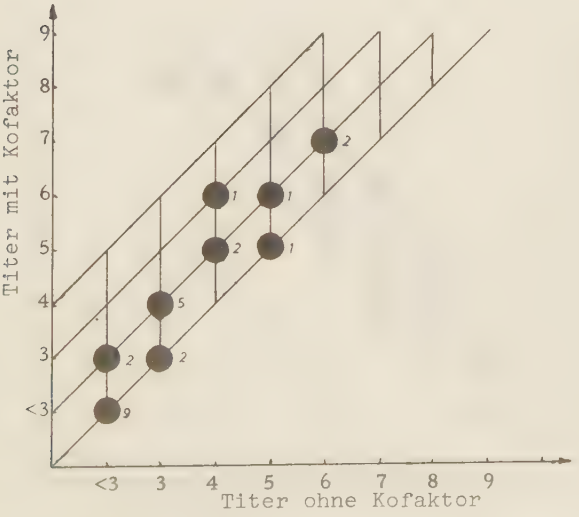


Schaubild 14: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter ohne bzw. mit Kofaktorzusatz für Influenza A_2/Tüb/63$^-$ bei 16-stünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper und Verwendung von Hühnererythrocyten

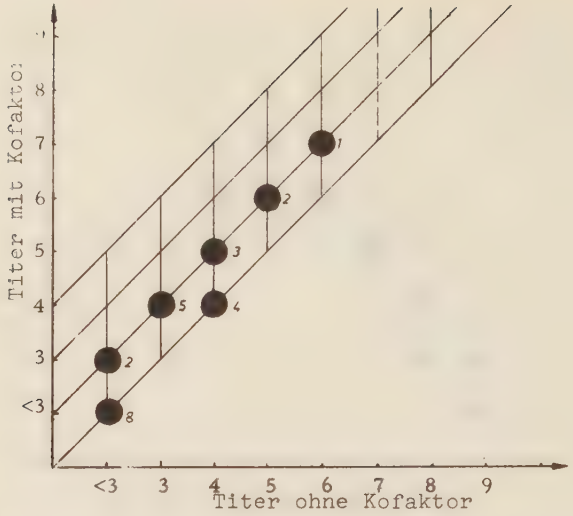


Schaubild 15: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter ohne bzw. mit Kofaktorzusatz für Influenza A_2/Tüb/6 bei halbstünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörp und Verwendung von Humanerythrocyten

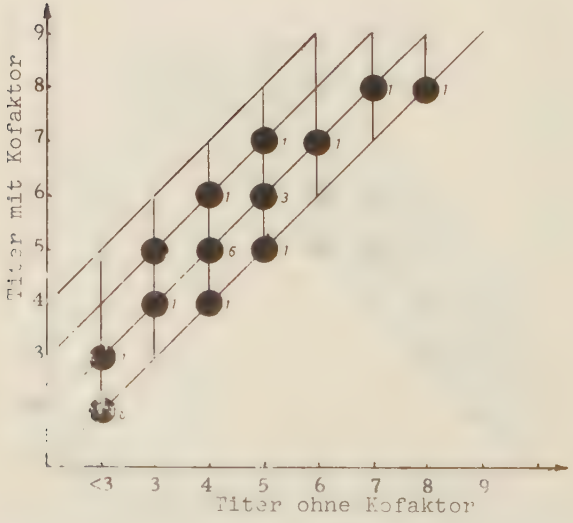
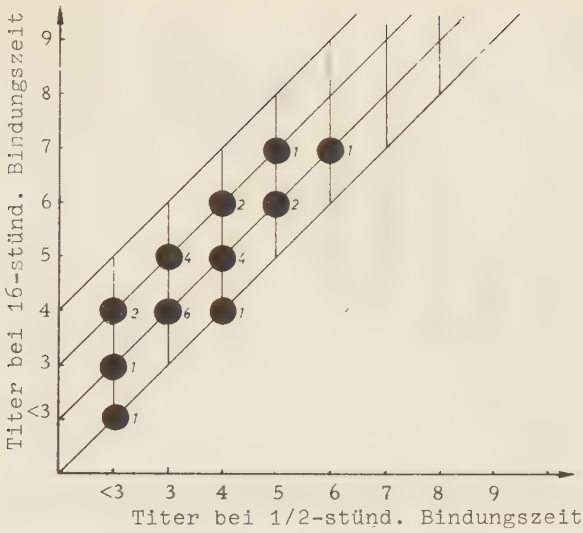
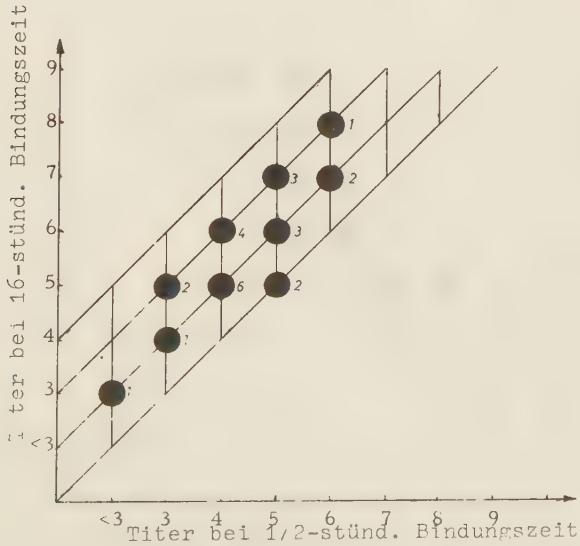


Schaubild 16: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter ohne bzw. mit Kofaktorzusatz für Influenza A_2/Tüb/6 bei 16-stünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörp und Verwendung von Humanerythrocyten



chaubild 17: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter bei halbstünd. bzw. ca. 16-stünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper für Influenza A_2/Tüb/63$^+$ bei Verwendung von Hühnererythrocyten, ohne Kofaktorzusatz



chaubild 18: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter bei halbstünd. bzw. ca. 16-stünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper für Influenza A_2/Tüb/63$^+$ bei Verwendung von Humanerythrocyten, ohne Kofaktorzusatz

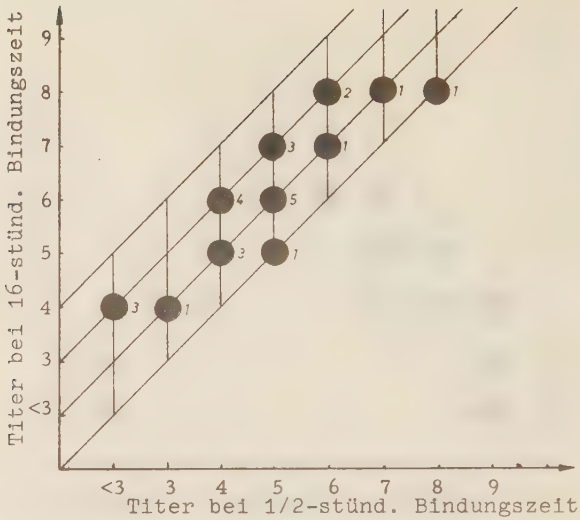


Schaubild 19: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter bei halbstünd. bzw. ca. 16-stünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper für Influenza A_2/Tüb/63 Verwendung von Hühnererythrocyten, mit Kofaktorzusa

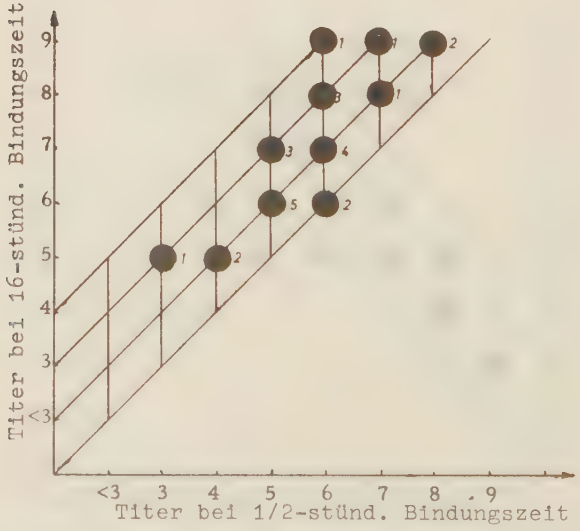


Schaubild 20: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter bei halbstünd. bzw. ca. 16-stünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper für Influenza A_2/Tüb/63 Verwendung von Humanerythrocyten, mit Kofaktorzusa

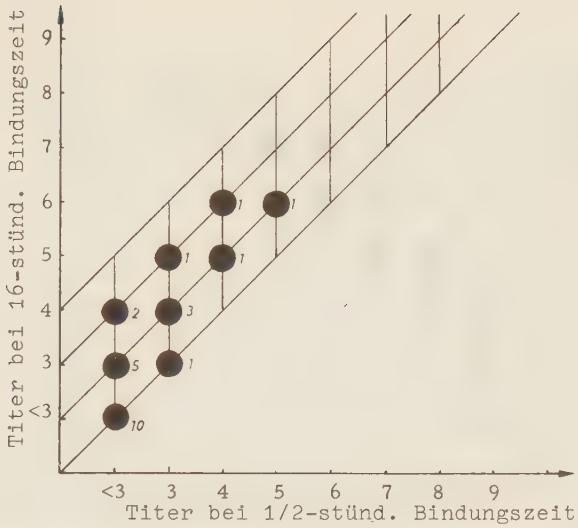


Schaubild 21: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter bei halbstünd. bzw. ca. 16-stünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper für Influenza A_2/Tüb/63$^-$ bei Verwendung von Hühnererythrocyten, ohne Kofaktorzusatz

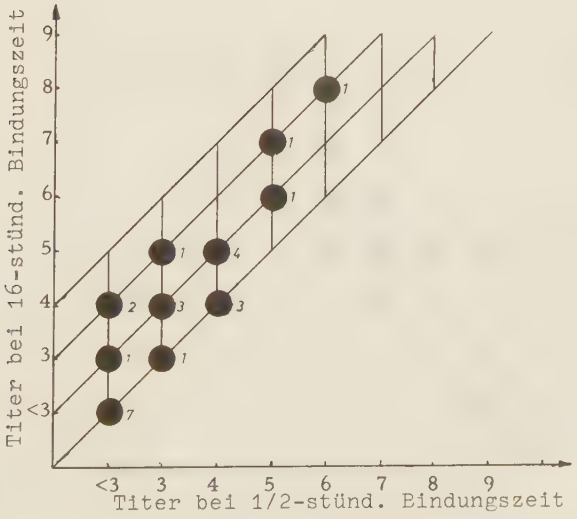


Schaubild 22: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter bei halbstünd. bzw. ca. 16-stünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper für Influenza A_2/Tüb/63$^-$ bei Verwendung von Humanerythrocyten, ohne Kofaktorzusatz

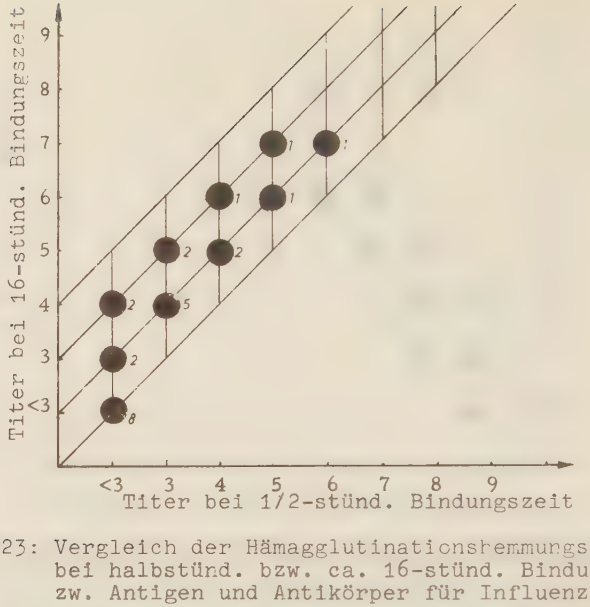


Schaubild 23: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter bei halbstünd. bzw. ca. 16-stünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper für Influenza A_2/Tüb/63
Verwendung von Hühnererythrocyten, mit Kofaktorzusa

Schaubild 24: Vergleich der Hämagglutinationshemmungstiter bei halbstünd. bzw. ca. 16-stünd. Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper für Influenza A_2/Tüb/63
Verwendung von Humanerythrocyten, mit Kofaktorzusa

4.) Vergleich der Routine - Hämagglutinationshemmungsreaktionen mit durch Kaliumperjodat und Neuraminidase inaktivierten Humanseren und der geänderten Versuchsmethode

Durch diese Experimente sollte geklärt werden, ob die Seren, die mit KJO_4 inaktiviert wurden, andere Titer aufwiesen als solche, die mit Neuraminidase inaktiviert wurden, und wie sich diese beiden Titer von denen unterscheiden, die durch die veränderten Versuchsparameter entstanden.

Dazu liefen für jedes Humanserum drei Versuchspaare mit dem I^+- und dem I^--Antigen parallel:

I: Ein Testpaar, bei dem das Serum mit KJO_4 inaktiviert wurde, und das nach halbstündiger Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper mit einer Hühnererythrocytensuspension versetzt wurde.

II: Ein Testpaar, bei dem das Serum mit Neuraminidase inaktiviert wurde und bei dem die übrigen Versuchsparameter wie oben gewählt wurden.

III: Ein Testpaar, bei dem das Serum mit Neuraminidase inaktiviert wurde und bei dem es nach ca. 16-stündiger Inkubation von Antigen und Antikörper unter Kofaktoreinwirkung mit Humanerythrocyten versetzt wurde.

Die Tabellen 4a und 4b stellen die Zweierlogarithmen der reziproken Titer dieser Versuchsreihen dar.

Tabelle 4a

Hämagglutinationshemmungstest mit Humanseren

	Alter des Serumspenders	79	71	70	69	66	65	63	61	61	59
	Testantigen										
I	A_2/Tüb/63$^+$	3	<3	3	3	<3	3	<3	4	<3	<3
I	A_2/Tüb/63$^-$	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	3	<3	<3
II	A_2/Tüb/63$^+$	3	3	3	3	<3	4	<3	4	<3	<3
II	A_2/Tüb/63$^-$	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	3	<3	<3
III	A_2/Tüb/63$^+$	4	4	4	5	4	7	7	8	5	4
III	A_2/Tüb/63$^-$	3	4	4	4	3	6	6	7	4	3

I: Seruminaktivierung mit KJO_4; Bindungszeit zw. Antigen u. Antikörper 1/2h; Hühnererythrocyten

II: Seruminaktivierung mit RDE; Bindungszeit zw. Antigen u. Antikörper 1/2h; Hühnererythrocyten

III: Seruminaktivierung mit RDE; Bindungszeit zw. Antigen u. Antikörper 16 h; Humanerythrocyten, Kofaktorzusatz

Tabelle 4b

Hämagglutinationshemmungstest mit Humanseren

	Alter des Serumspenders	58	52	36	33	28	28	27	25	25	21
	Testantigen										
I	A_2/Tüb/63$^+$	<3	<3	4	4	3	<3	<3	4	<3	<3
	A_2/Tüb/63$^-$	<3	<3	3	3	<3	<3	<3	3	<3	<3
II	A_2/Tüb/63$^+$	<3	<3	4	5	4	<3	<3	5	<3	3
	A_2/Tüb/63$^-$	<3	<3	3	4	3	<3	<3	4	<3	<3
III	A_2/Tüb/63$^+$	4	4	6	8	6	6	6	6	5	6
	A_2/Tüb/63$^-$	3	4	5	7	5	5	5	5	4	5

I: Seruminaktivierung mit KJO_4; Bindungszeit zw. Antigen u. Antikörper 1/2h; Hühnererythrocyten

II: Seruminaktivierung mit RDE; Bindungszeit zw. Antigen u. Antikörper 1/2h; Hühnererythrocyten

III: Seruminaktivierung mit RDE; Bindungszeit zw. Antigen u. Antikörper 16 h; Humanerythrocyten, Kofaktorzusatz

Auswertung von Tabelle 4:

Um die Titeränderungen nicht nur für jedes Serum einzeln feststellen zu können, wurde für jede Testreihe der Mittelwert der reziproken Titer ermittelt; dazu wurde anstelle der Werte <8 der fiktive Titer 4 angenommen, obwohl so nur Anhaltspunkte gewonnen werden können, weil nicht vorausgesetzt werden kann, daß alle Seren mit dem reziproken Titer <8 die Hämagglutination bei der Serumverdünnung 1:4 gehemmt hätten, und weil die Titeranstiege individuell stark variierten.

Tabelle 5 stellt die Mittelwerte der reziproken Titer dieser Testreihen mit Humanseren dar.

Tabelle 5	I	II	III
A_2/Tüb/63$^+$	6,3	7,7	43,7
A_2/Tüb/63$^-$	4,6	5,1	23,4

I: Seruminaktivierung mit KJO_4
halbstündige Bindungszeit zw. Antigen u. Antikörper
Verwendung von Hühnererythrocyten

II: Seruminaktivierung mit RDE
halbstünd. Bindungszeit zw. Antigen u. Antikörper
Verwendung von Hühnererythrocyten

III: Seruminaktivierung mit RDE
16-stündige Bindungszeit zw. Antigen u. Antikörper
Kofaktorzusatz
Verwendung von Humanerythrocyten

Aus Tabelle 5 ist ersichtlich, daß die Titer der Hämagglutinationshemmungsversuche, bei denen die Seren mit Kaliumperjodat inaktiviert wurden, nur geringfügig niedriger waren als diejenigen, wenn die Seren mit Receptor Destroying Enzyme behandelt wurden.

Dagegen stiegen die Titer durch Änderung der Methodik in Versuchsreihe III stark an.

Werden die Verhältnisse der Mittelwerte berechnet, scheinen die Titer für Influenza $A_2/Tüb/63^+$ stärker anzusteigen als für Influenza $A_2/Tüb/63^-$; beim Routineversuch wurde jedoch mit dem I^--Antigen sehr häufig der reziproke Titer <8 erzielt, während in den nach der Versuchsmethode III ausgeführten Tests in allen hier erwähnten Seren gegen diesen Virusstamm hämagglutinationshemmende Substanzen gefunden wurden.

Es kann also nur festgestellt werden, daß die Titer für beide Antigene durch Änderung der Versuchsparameter gegenüber der Standardmethode signifikant anstiegen und daß dabei die Titer gegen Influenza $A_2/Tüb/63^-$ niedriger waren als gegen $A_2/Tüb/63^+$.

5.) Das Zusammenwirken der geänderten Versuchsparameter auf die Titer der Hämagglutinationshemmungstests mit Humanseren

Die Untersuchung der Humanseren auf hämagglutinationshemmende Substanzen hatte ergeben, daß sowohl die Verwendung von Humanerythrocyten der Blutgruppe O wie auch der Zusatz von Kofaktor in Form von Mäusenormalserum und eine Verlängerung der Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper einen Titeranstieg zur Folge haben können. Die höchsten Titer wurden durch die Änderung aller drei Versuchsparameter erzielt.

Die Tabellen 6a und 6b zeigen die Titeranstiege im Hämagglutinationshemmungsversuch mit 45 Humanseren bei Änderung dieser drei Parameter gegenüber der Routinemethode (Seruminaktivierung mit RDE, halbstünd. Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper, Verwendung von Hühnererythrocyten) in Abhängigkeit vom Alter der Serumspender für das Antigen $A_2/Tüb/63^+$ und $A_2/Tüb/63^-$; die Ziffern bedeuten die Anzahl der Seren, die im Hämagglutinationshemmungsversuch den betreffenden Titeranstieg aufwiesen.

Tabelle 6a:

Übersicht über die Titeranstiege bei Änderung der Method
in allen drei Versuchsparametern für Influenza $A_2/Tüb/63$

Alter der Serumspender	0-9 J.	10-19 J.	20-29 J.	30-39 J.	>50
Titeranstieg um 1 Stufe	0	0	1	0	3
Titeranstieg um 2 Stufen	0	0	1	1	7
Titeranstieg um 3 Stufen	5	3	3	1	4
Titeranstieg um 4 Stufen	0	5	3	0	5
Titeranstieg um 5 Stufen	0	0	0	0	3

Tabelle 6b:

Übersicht über die Titeranstiege bei Änderung der Methode in allen drei Versuchsparametern für Influenza A_2/Tüb/63⁻

Alter der Serumspender	0-9 J	10-19 J	20-29 J	30-39 J	>50 J
Titeranstieg um 0 Stufen	3	1	0	0	3
Titeranstieg um 1 Stufe	1	0	1	0	7
Titeranstieg um 2 Stufen	1	1	3	1	4
Titeranstieg um 3 Stufen	0	4	4	1	5
Titeranstieg um 4 Stufen	0	2	0	0	3

Bei Betrachtung der Tabelle 6 läßt sich eine Gesetzmäßigkeit in Abhängigkeit vom Alter der Serumspender nicht erkennen, wie sie nach den Versuchen mit Mäusefrüh- und hyperimmunseren zu erwarten gewesen wäre. Dies kann jedoch dadurch bedingt sein, daß dazu die Anzahl der untersuchten Seren zu gering war.

In den folgenden Schaubildern 25 und 26 werden für den I^+- und den I^--Stamm die Titer des Hämagglutinationshemmungsversuchs mit diesen 45 Humanseren, die bei Anwendung der Routinemethode und bei Änderung der drei Versuchsparameter entstanden, verglichen. Dabei sind auf den Koordinatenachsen die Zweierlogarithmen der reziproken Titer aufgetragen.

Als Routinemethode wird der Test mit folgenden Versuchskomponenten bezeichnet: Seruminaktivierung mit RDE, halbstündige Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper und Verwendung von Hühnererythrocyten. Geänderte Methode wird der Test mit diesen Versuchskomponenten genannt: Seruminaktivierung mit RDE, 16-stündige Bindungszeit zw. Antigen und Antikörper und Verwendung von Humanerythrocyten der Blutgruppe 0 und Kofaktorzusatz.

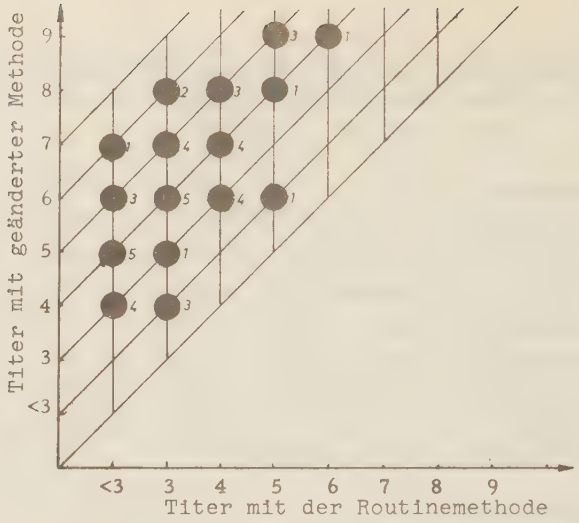


Schaubild 25: Vergleich der Titer des Hämagglutinationshemmungstests mit Humanseren nach der Routinemethode und der geänderten Methode für Influenza A_2/Tüb/63$^+$

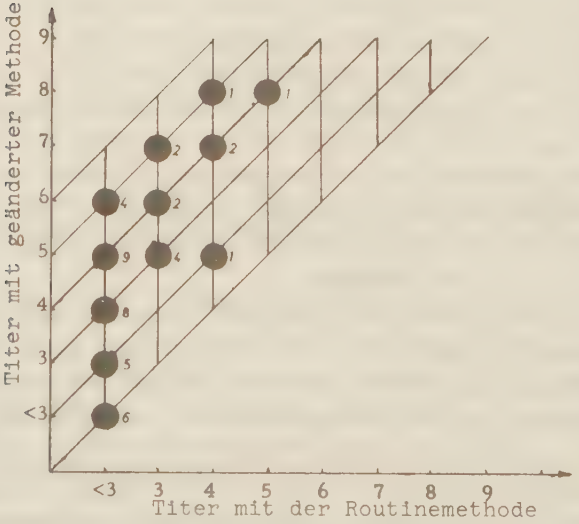


Schaubild 26: Vergleich der Titer des Hämagglutinationshemmungstests mit Humanseren nach der Routinemethode und der geänderten Methode für Influenza A_2/Tüb/63$^-$

6.) Versuche mit Humanseren ohne nachweisbare Hämagglutinationshemmung

Bisher wurden nur solche Seren erwähnt, die eine Hemmung der Hämagglutination erkennen ließen. Nun muß ergänzt werden, daß viele Seren von Spendern aller Altersstufen auch durch die Änderung der Versuchsparameter keine Hämagglutinationshemmung hervorriefen.

Bei den in Abschnitt 4 geschilderten Experimenten wiesen 16 Seren weder bei Verwendung von Humanerythrocyten der Blutgruppe O noch bei Kofaktorzusatz noch bei 16-stündiger Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper weder gegen Influenza A_2/Tüb/63$^+$ noch gegen A_2/Tüb/63$^-$ Hämagglutinationshemmung auf. Von diesen Seren stammten 7 von Erwachsenen über 20 Jahren und 9 von Kindern im Alter von 1 - 2 Jahren. Weitere 18 Seren von Kleinkindern von 0 - 4 Jahren wurden, wie in Abschnitt 5 beschrieben, getestet und zeigten ebenfalls in keinem Versuch Hämagglutinationshemmung. Auch bei einer zu 1:4 gewählten Anfangsverdünnung der Seren waren keine Titeranstiege erkennbar, wenn die Versuchsparameter geändert wurden.

Die Tabellen 7a und 7b geben eine Übersicht über die Seren, welche die Hämagglutination auch bei verlängerter Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper, Kofaktorzusatz und Verwendung von Humanerythrocyten der Blutgruppe O nicht hemmten.

Tabelle 7a:

Übersicht über die Erwachsenenseren, die die Hämagglutination auch bei Änderung der Versuchsparameter nicht hemmten

Alter der Serumspender	Anzahl der Seren
67 J.	1
48 J.	1
39 J.	1
35 J.	2
30 J.	1
22 J.	1

Tabelle 7b:

Übersicht über die Kinderseren, die die Hämagglutination auch bei Änderung der Versuchsparameter nicht hemmten

Altersgruppe der Serumspender	Anzahl der Seren
0 - 1 J.	3
1 - 2 J.	11
2 - 3 J.	9
3 - 4 J.	4

7.) Kontrollen

1.) Mit jedem Hämagglutinationshemmungsversuch lief eine Antigentitration parallel. Die antigenhaltige Allantoisflüssigkeit wurde so weit verdünnt, daß sie den Hämagglutinationstiter 1:8 aufwies; damit waren in 0,025 ml Suspension 4 hämagglutinierende Einheiten Antigen. Dieser Wert wurde mit Hühner- und Humanerythrocyten erreicht; er änderte sich auch nicht, wenn Kofaktor zugesetzt wurde, und blieb über einen erheblich größeren Zeitraum als 16 Stunden bei Zimmer- oder Kühlschranktemperatur gleich.

2.) Bei den Hämagglutinationshemmungstests mit Mäuseimmunseren und bei 10 Versuchen mit Humanseren wurde Kofaktor auf seine Thermolabilität geprüft. Dazu wurde er vor Gebrauch eine halbe Stunde auf 56 ^{0}C im Wasserbad erhitzt. Die Ergebnisse der mit Zusatz von so behandeltem Mäusenormalserum ausgeführten Versuche deckten sich innerhalb der Fehlergrenzen mit denen, wenn kein Kofaktor verwendet wurde.

3.) Jedes Serum wurde auf unspezifische hämagglutinationshemmende Substanzen untersucht. Diese Serumkontrolle bestand aus 0,025 ml phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung mit oder ohne Kofaktorzuatz und 0,025 ml inaktiviertem Serum. Dazu wurden 0,05 ml Hühner- oder Humanerythrocytensuspension gegeben. In keinem Fall agglutinierten die Erythrocyten ohne das Vorhandensein von Antigen.

IV. Diskussion

1.) Methodik

1.) Das Mikrotitersystem (G.TAKÁTSY, 1955) eignet sich infolge des rationellen Verfahrens der Versuchsdurchführung und der kleinen Quantitäten, die benötigt werden, gut zu Serien von Hämagglutinationshemmungsversuchen. Nach J.L.SEVER (1962) bestehen zwischen den Ergebnissen der Standardmakromethode und der Mikromethode kaum Unterschiede.

In dieser Arbeit wurden sowohl Antigentitrationen wie auch Hämagglutinationshemmungsversuche mit derselben Antigen- bzw. Serumprobe bis zu vier Mal wiederholt; dabei wurde festgestellt, daß die Ergebnisse mit seltenen Abweichungen von ± 1 Titerstufe reproduzierbar waren.

2.) Die Immunseren von NMRI-Mäusen wiesen gegen das Testantigen $A_2/Tüb/63^+$ höhere Titer auf als gegen $A_2/Tüb/63^-$, gleich, mit welchem Antigen die Tiere infiziert worden waren. Alle Seren der einmal mit $A_2/Tüb/63^+$ immunisierten Tiere hatten gegen den I^--Stamm einen Hämagglutinationstiter $<(1:8)$, während die Seren der mit $A_2/Tüb/63^-$ beimpften Tiere 14 bzw. 21 Tage nach der Infektion die Hämagglutination mit diesem Antigen hemmten. Bei den mehrfach immunisierten Tieren ist fraglich, ob bei wiederholter intranasaler Antigengabe eine Virusvermehrung erfolgte, weil die Titer dieser Seren ähnlich waren wie die der Seren, die 21 Tage nach einmaliger Beimpfung gewonnen wurden.

Ein deutlicher Unterschied zeigte sich lediglich darin, daß im Serum, das nach mehrmaliger Immunisierung der Tiere mit A_2/Tüb/63$^+$ hergestellt wurde, bei Kofaktorzusatz sowohl bei halbstündiger wie bei ungefähr 16-stündiger Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper gegen den I$^-$-Stamm Hämagglutinationshemmung nachgewiesen wurde, während dies im entsprechenden Immunserum, das durch einmalige intraperitoneale Antigengabe erzeugt wurde, nicht der Fall war. Möglicherweise wäre dieser Unterschied nicht mehr vorhanden gewesen, wenn das Serum, zu dessen Präparation die Tiere nur einmal infiziert wurden, noch später gewonnen worden wäre (S.FAZEKAS de St. GROTH und R.G.WEBSTER, 1964).

Zusammenfassend kann für die Mäuseimmunseren gesagt werden, daß die Seren, die durch Infektion der Tiere mit dem Antigenstamm geringer Avidität, also mit Influenza A_2/Tüb/63$^-$, gewonnen wurden, im Hämagglutinationshemmungsversuch eine größere immunologische Breite erkennen ließen als die Seren der mit dem I$^+$-Stamm infizierten Tiere.

Die Feststellung, daß die Titer gegen Influenza A_2/Tüb/63$^-$ im Hämagglutinationshemmungstest niedriger waren als gegen A_2/Tüb/63$^+$, galt auch für die untersuchten Humanseren, in denen nur in drei Fällen bei Versuchsdurchführung mit anderen Parametern die Titer gegen beide Antigenarten gleich hoch waren; dies könnte in der Fehlerbreite begründet sein.

3.) Zur Seruminaktivierung, d.h. zur Beseitigung der Wirksamkeit unspezifischer hämagglutinationshemmender Substanzen, kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht, unter anderen die Inaktivierung mit KJO_4, Trypsin und Neuraminidase. In den Untersuchungen von B.STYK et al. (1961) zeigte sich, daß KJO_4 nicht nur den Kofaktor zerstört, sondern auch spezifische Antikörper beschädigt, so daß der ursprüngliche Hämagglutinationshemmungstiter auch durch Zusatz von Mäusenormalserum nicht wieder hergestellt werden konnte. Desgleichen erwies sich in diesen Experimenten die Seruminaktivierung mit Trypsin als nicht günstig, weil unspezifische Gamma-Inhibitoren nicht zerstört wurden und weil Hühnererythrocyten durch dieses Ferment auch bei hohen Verdünnungen agglutiniert wurden (B.STYK et al., 1961).

Bei der Seruminaktivierung mit Neuraminidase wird die Enzymtätigkeit durch die Erhitzung auf 56 ^{0}C gestoppt, und der ursprüngliche Titer konnte durch Kofaktorzusatz wieder hergestellt werden (B.STYK et al., 1961).

In dieser Arbeit wurde festgestellt, daß die Titer in Hämagglutinationshemmungsversuchen mit Humanseren, die mit KJO_4 inaktiviert worden waren, und die Titer derselben mit Neuraminidase behandelten Seren sich geringfügig unterschieden, wie in Tabelle 5 dargestellt ist. Neuraminidase inaktivierte die Seren schonender, und es kann wohl angenommen werden, daß es sich bei den dabei ermittelten höheren Titern um spezifische Antikörper handelte, welche die Hämagglutinationshemmung bewirkten.

2.) Der Einfluß der Erythrocytenart auf die Titer des Hämagglutinationshemmungstests

Vor allem bei Verwendung des gegen Antikörper und Inhibitoren unempfindlichen Influenza A_2-Stamms zum Antikörpernachweis im Hämagglutinationshemmungsversuch werden häufig negative Ergebnisse festgestellt. Deswegen ist von einigen Autoren (M.R.HILLEMAN u. Mitarb., 1958; K.E.JENSEN, 1957; L.J.ZAKSTELSKAYA, 1958) vorgeschlagen worden, im Hämagglutinationshemmungstest nur das Antigen mit größerer Avidität zu nehmen.

Eine relativ einfache Methode, die Hämagglutinationshemmungsreaktion gegen die nicht aviden Stämme empfindlicher zu machen, ist die Ätherbehandlung der Antigene (H.J.GERTH u.a., 1964). Dabei wurden Titererhöhungen für beide Antigenarten registriert; die Empfindlichkeit gegen Gamma - Inhibitoren nahm jedoch nur beim aviden Antigen zu.

Die niedere Sensitivität des Hämagglutinationshemmungsversuchs gegenüber dem unempfindlichen Antigen erklären A.A.SMORODINTSEV et al. (1958) folgendermaßen: Beide Antigenarten sind in Humanseren immunologisch gleich aktiv und veranlassen die Bildung hämagglutinationshemmender Antikörper. Das Virus wird sogleich an die Hühnererythrocyten adsorbiert, welche es aus der lockeren Verbindung

mit dem Antikörper verdrängen; dadurch wird ein Fehlen von Antikörpern vorgetäuscht. Humanerythrocyten der Blutgruppe O zeigen diesen Effekt weniger. Sie adsorbierten in den Untersuchungen von G.I.ALEXANDROVA (1959) tausendmal weniger Virus als Hühnererythrocyten bei Vorhandensein von Antikörpern, während sie bei fehlenden Antikörpern im Hämagglutinationsversuch gleichviel Antigen adsorbierten. Diese Autorin diskutiert, ob nicht die Influenza A_2-Stämme von geringer Avidität zum Antikörpernachweis im Hämagglutinationshemmungstest verwendet werden sollten, weil in ihren Versuchen mit Humanerythrocyten der Blutgruppe O besonders bei verlängerter Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper die Titer gegen die I^--Stämme denen gegen die aviden Antigene angenähert waren und manchmal sogar höher wurden.

In der vorliegenden Arbeit bestand in den Hämagglutinationshemmungsversuchen mit Mäuseseren zwischen den Titern mit Hühner- und Humanerythrocyten kein Unterschied, während die Titer mit Humanerythrocyten der Blutgruppe O in den Experimenten mit Humanseren deutlich höher waren als mit Hühnererythrocyten. Eine wesentliche Annäherung der Titer gegen Influenza $A_2/Tüb/63^+$ und gegen $A_2/Tüb/63^-$ wurde dabei nicht registriert, weder bei Kofaktorzusatz noch bei verlängerter Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper.

3.) Der Einfluß von Kofaktor auf die Titer des Hämagglutinationshemmungstests

Die immunologische Aktivität von Seren, die erhitzt oder über einen längeren Zeitraum gelagert wurden, kann durch Zugabe von normalen Tierseren erhöht werden (M.N.GORDON, 1925; H.MUELLER, 1931). Der Begriff Kofaktor bezeichnet eine thermolabile Komponente normaler Tierseren, die zur Reaktion spezifischer Antikörper mit Influenza A_2-Virus notwendig ist (B.STYK et al., 1959).

Die Thermolabilität von Kofaktor zeigte sich in den Kontrollversuchen der vorliegenden Arbeit, d.h. die Titer der Hämagglutinationshemmungsversuche mit Mäuseimmun- und Humanseren, die mit Zusatz von erhitztem Mäusenormalserum durchgeführt wurden, waren innerhalb der Fehlergrenzen gleich wie ohne Kofaktorzusatz.

Bei Kofaktortitrationen (B.STYK, 1961) erwies sich, daß als Kofaktorquelle die Seren von Mäusen, Ratten und Rindern in Frage kommen; auch Humanseren besitzen eine große Menge Kofaktor. Normalserum von NMRI - Mäusen ist infolge des Fehlens unspezifischer Inhibitoren das geeignetste. Mäuseserum sollte vor Gebrauch zur Entfernung unspezifischer Hämolysine oder Agglutinine an die Testerythrocyten adsorbiert werden.

Der Ausdruck "Nonspecific Thermolabile Stimulator of Antibodies" (A.A.YABROV and A.A.SMORODINTSEV, 1962) verdeutlicht die Wirkung und die Natur von Kofaktor, der zu den Proteinen der Makroglobulinfraktion gehört (L.HÁNA et al., 1961).

Die mit Kofaktor erzielten höheren Titer des Hämagglutinationshemmungsversuchs könnten nun daher rühren, daß er identisch wäre mit Alpha - Inhibitoren (D.A.J.TYRRELL, 1954), dem Beta - Inhibitor (C.M.CHU, 1951) oder dem Gamma - Inhibitor (H.A.SHIMOJO et al., 1958; A.COHEN and G.BELYAVIN, 1959), was aber durch die unterschiedliche Empfindlichkeit von Kofaktor und diesen Inhibitoren gegen Hitze bzw. der Möglichkeit der getrennten Titration von Kofaktor und dem Beta - Inhibitor auszuschließen ist (B.STYK, 1961).

Ein weiterer Beweis, daß die Titeranstiege durch Kofaktor eine spezifische Reaktion bedeuten, ist, daß in vielen in dieser Arbeit untersuchten Seren trotz Kofaktorzusatz keine Hämagglutinationshemmung ausgelöst wurde, besonders in den Seren von Kleinkindern, die wohl noch nicht mit Influenza A_2 infiziert worden waren. Es findet also bei Kofaktorzusatz offensichtlich keine Kombination mit einer unspezifischen Teilkomponente von Seren statt, die zur Bildung eines unspezifischen Inhibitors führt.

V.M.ZHDANOV und V.M.STAKHANOVA (1961) erklären die Tatsache, daß die Titer von Frühimmunseren bei Erhitzung stärker abfallen als die von Hyperimmunseren damit, daß eine spezielle Gruppe von Antikörpern der frühen Periode der Immunisierung durch die Hitzeeinwirkung zerstört würden, die in Hyperimmunseren nicht mehr vorhanden seien.

Die Bildung von bei Zentrifugierung schnell sedimentierenden Antikörpern der 19S-Fraktion ist ein wichtiger Bestandteil der Immunisierung (J.W.UHR et al., 1962) und wurde für Influenza - Viren von B.S.BERLIN (1963) und von B.STYK und L.HÁNA (1964) nachgewiesen. In den Untersuchungen von B.STYK und L.HÁNA (1965) erfolgte in Mäuse-immunseren i.a. zuerst die Bildung von 19S-Antikörpern, die später von 7S-Antikörpern ersetzt wurden; manchmal wurden beide Antikörperarten gleichzeitig beobachtet, und in einigen Fällen waren in Frühimmunseren sogar mehr 7S-Antikörper als 19S-Antikörper vorhanden.

Da die Titer von hitzeinaktivierten Frühimmunseren in den Experimenten von B.STYK (1962) bei Zugabe von Kofaktor nicht immer stärker anstiegen als die von Hyperimmunseren, wurde für die Antikörper, die durch Kofaktor stimuliert wurden, statt des Ausdrucks "frühe Antikörper" der Terminus "unvollständige Antikörper" geprägt, die sowohl zur 19S- wie zur 7S-Fraktion gehören können. Die Antikörper, die durch Kofaktor in ihrer Reaktion mit dem Antigen nicht stimuliert wurden, wurden "klassische Antikörper" genannt (B.STYK and L.HÁNA, 1961 a und b; B.STYK, 1961).

Diese Ausdrücke dürften heute besser in "wenig avide" und "avide" Antikörper umbenannt werden (S.FAZEKAS de St. GROTH and R.G.WEBSTER, 1964). Diese Autoren stellten fest, daß schon nach einmaliger Immunisierung maximale Antikörper-

produktion erfolgt, wobei aber die Antikörperarten durch ihre unterschiedlich feste Bindung, die sich als Dissoziationskonstante des Antigen - Antikörper - Komplexes messen läßt, unterschieden werden können. Titerunterschiede von verschiedenen Seren sind lediglich der Ausdruck unterschiedlich fester Bindung der Reaktionspartner. Je länger der Zeitpunkt der Infektion zurückliegt, desto mehr steigt die Avidität der Antikörper.

Die Titer der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mäuseimmunseren, die nach einmaliger Immunisierung gewonnen wurden, stiegen im Durchschnitt bei Kofaktorzusatz stärker an als die der Seren von mehrfach infizierten Mäusen, sowohl gegen Influenza $A_2/Tüb/63^+$ als auch gegen $A_2/Tüb/63^-$. In den beiden Seren, die 10 Tage nach einmaliger Immunisierung gewonnen wurden, stiegen die Titer gegen den I^+-Stamm um 3 bzw. 4 Stufen an, während Kofaktor in den Spätimmunseren, die nach wiederholter intraperitonealer Impfung gewonnen wurden, nur einen Titeranstieg um 1 Stufe bewirkte; dabei ist bemerkenswert, daß in den beiden Frühimmunseren gegen das I^--Antigen auch bei Kofaktorzusatz die Hämagglutination nicht gehemmt wurde. Auch in den anderen Seren erreichten die Titer gegen den I^+- und den I^--Stamm bei Kofaktorzusatz nie dieselbe Höhe, während B.STYK und L.HÁNA (1965) in Frühseren, die durch Immunisierung mit dem I^--Antigen gewonnen wurden, gegen den I^+-Stamm niedrigere Titer fest-

stellten als gegen den I^--Stamm. In ihren Experimenten waren erst nach mehrmaliger Immunisierung der Mäuse mit dem I^--Antigen die Titer gegen das avide A_2-Virus immer höher als gegen das nicht avide.

Das Serum, das 21 Tage nach einmaliger Infektion der Mäuse gewonnen wurde, könnte den obigen Ausführungen zufolge wohl eher den Seren von größerer Avidität zugerechnet werden, so daß die Unterschiede zwischen den Titeranstiegen früher und später Immunseren bei Kofaktorzusatz noch stärker wären als es in dieser Arbeit zum Ausdruck kommt.

In Humanseren wurde mit abnehmendem Alter der Serumspender bei Kofaktorzusatz kein vermehrtes Ansteigen der Hämagglutinationshemmungstiter registriert. Der Grund dafür dürfte weniger darin zu suchen sein, daß eine wiederholte Infektion vorlag, als darin, daß auch bei den jungen Menschen der Zeitpunkt der Infektion länger zurücklag und es sich daher um Seren von größerer Avidität handelte.

Da Kofaktor auch bei verlängerter Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper und auch mit Humanerythrocyten der Blutgruppe O die Reaktion zwischen Antigen und Antikörper verbesserte, dürfte es sich bei diesen Titeranstiegen um die weniger aviden Antikörper handeln, die nur durch Kofaktor zur Verbindung mit dem Antigen befähigt wurden.

4.) Der Einfluß der Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper auf die Titer des Hämagglutinationshemmungstests

Die Versuche dieser Arbeit zeigten, daß bei auf ungefähr 16 Stunden verlängerter Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper im Hämagglutinationshemmungsversuch höhere Titer beobachtet wurden. G.I.ALEXANDROVA (1959) hatte festgestellt, daß die Titer von der Zeit der Inkubation von Antigen und Antikörper abhängig sind, weil die Immunreaktion nicht sofort nach Zugabe von Virus vollständig abläuft. Bei einer über 16 Stunden hinaus verlängerten Inkubation von Antigen und Antikörper findet keine weitere Titererhöhung statt (G.I.ALEXANDROVA, 1959).

In den Hämagglutinationshemmungsversuchen dieser Autorin mit Humanseren waren die Ergebnisse mit den gegen Antikörper und Inhibitoren unempfindlichen Influenza A2-Stämmen auch nach verlängerter Bindungszeit häufig negativ, sofern Hühnererythrocyten verwendet wurden. Mit Humanerythrocyten der Blutgruppe O waren die Titer gegen die I^+- und die I^--Antigenstämme bei verlängerter Bindungszeit ungefähr gleich hoch.

In den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen mit Influenza A_2/Tüb/63$^+$ und A_2/Tüb/63$^-$ waren die Titer gegen den I^--Stamm fast immer niedriger, sowohl in Mäuseimmunseren wie Humanseren, und die bei verlängerter Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper beobachteten Titeranstiege waren mit Hühner- und Humanerythrocyten für beide Antigenstämme etwa gleich groß.

V. Zusammenfassung

1.) Bei Hämagglutinationshemmungsversuchen mit Mäuseimmunseren ergaben Hühnererythrocyten dieselben Titer wie Humánerythrocyten der Blutgruppe O.

2.) Bei Hämagglutinationshemmungsversuchen mit Humanseren ergaben Humanerythrocyten der Blutgruppe O höhere Titer als Hühnererythrocyten. Dabei entsprach das Verhalten der Titer mit Influenza A_2/Tüb/63^+ prinzipiell dem der Titer mit dem Antigen A_2/Tüb/63^-.

3.) Der Zusatz von Kofaktor in Form von Mäusenormalserum erhöhte die Titer im Hämagglutinationshemmungstest mit Mäusefrühimmunseren, Mäusespätimmunseren und Humanseren bei Verwendung des I^+- und des I^--Antigens prinzipiell gleich, und zwar sowohl bei halbstündiger wie bei ungefähr 16-stündiger Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper mit Human- und Hühnererythrocyten.

4.) Eine von 30 Minuten auf ungefähr 16 Stunden verlängerte Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper erhöhte die Titer in Hämagglutinationshemmungsversuchen mit Mäusefrühimmunseren, Mäusespätimmunseren und Humanseren bei Gebrauch beider Antigenarten.

5.) Die höchsten Titer in Hämagglutinationshemmungsversuchen mit Humanseren wurden durch Änderung der Routinemethode in folgenden Parametern erzielt:

a) Verwendung von Humanerythrocyten der Blutgruppe O statt Hühnererythrocyten;

b) Zusatz von Kofaktor in Form von Mäusenormalserum;

c) Verlängerung der Bindungszeit zwischen Antigen und Antikörper von 1/2 Stunde auf ungefähr 16 Stunden.

6.) In Hämagglutinationshemmungsversuchen mit geänderten Versuchsparametern waren die Titeranstiege gegenüber der Routinemethode für Influenza A_2/Tüb/63$^+$ und A_2/Tüb/63$^-$ prinzipiell gleich, ohne daß es zu einer wesentlichen Annäherung der Titer kam.

VI. Literaturverzeichnis

1. ALEXANDROVA, G.I.:
Pecularities of haemagglutination inhibition test with type A_2 influenza viruses
Acta virol. 6, 1 (1959)

2. BERLIN, B.S.:
The nature of antibodies in mice injected with influenza virus vaccine
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 113, 1013 (1963)

3. BURNET, F.M. and STONE, J.D.:
The receptor destroying enzyme of V.cholerae
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 25, 227 (1947)

4. CHU, C.M.:
The action of normal mouse serum on influenza viruses
J. gen. Microbiol. 5, 739 (1951)

5. COHEN, A. and BELYAVIN, G.:
Haemagglutination inhibition of Asian influenza viruses. A new pattern of response
Virology 7, 59 (1959)

6. Expert Committee on Respiratory Virus Diseases:
First report. Wld. Hlth. Org. techn. Rep. Ser., 170 (1959)

7. FAZEKAS de St. GROTH, S. and WEBSTER, R.G.:
The antibody response
in: Ciba Foundation Symposium on cellular biology of myxovirus infections, WOLSTENHOLME, G.E. and KNIGHT, J. (ed.), J. and A. Churchill, London 1964

8. GERTH, H.J. und STIFTER, I.:
Die Verwendung von Influenza A_2-Antigenen verschiedener Antikörperempfindlichkeit und deren Ätherpräparationen zur Aufstellung von Antikörperkatastern
Zeitschrift f. Hygiene 150, 121 (1964)

9. GERTH, H.J.:
Über die Variabilität von Influenza A_2-Viren
Habilitationsschrift, Tübingen 1969

10. GORDON, M.N.:
Studies of the viruses of vaccinia and variola
Med. Research Council, Special Report series, No. 98, London 1925, p. 66

11. HÁNA, L., KRIZANOVÁ, O., STYK, B., and SOKOL, F.:
Some data on the nature of cofactor enhancing the activity of imperfect antibodies against A_2 influenza virus strains
Acta virol. 5, 325 (1961)

12. HILLEMAN, M.R., FLATLEY, F.J., ANDERSON, S.A., LEUCKING, M.L., and LEWISON, D.J.:
Antibody response in volunteers to Asian influenza vaccine
J. Amer. med. Ass. 166, 1134 (1958)

13. HIRST, G.K.:
The agglutination of Red Cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus
Science 94, 22 (1941)

14. JENSEN, K.E.:
New set of type A influenza viruses
J. Amer. med. Ass. 164, 2025 (1957)

15. LENNETTE, E.H. and SCHMIDT, N.J. (eds.):
Diagnostic procedures for viral and rickettsial diseases
Am. Public Health Assoc., New York 1964, ed. 3

16. MUELLER, J.H.:
The effect of aleskin in virus - antivirus mixtures
J. Immunol. 20, 17 (1931)

17. SALK, J.E.:
Reactions to concentrated influenza virus vaccines
J. Immunol. 58, 369 (1948)

18. SEVER, J.L.:
Application of a microtechnique to viral serological investigations
J. Immunol. 88, No.3, 320 (1962)

19. SHIMOJO, H.A., SUGIURA, T., AKAO and ENOMOTO, C.:
Studies of a nonspecific haemagglutination inhibitor of influenza A/Asian/57 virus
Bull. Inst. Pub. Health, Tokyo 7, 219 (1958)

20. STYK, B., KOCISCOVÁ, D., and BLASKOVIC, D.:
Dynamics of immunological response to infection with Asian type (A_2) influenza virus strain
Acta virol. 3, (Supplem.), 97 (1959)

21. STYK, B.:
Cofactor and specific antibodies against influenza viruses:I: A method of cofactor titration. Cofactor content of various animal sera
Acta virol, 5, 334 (1961)

22. STYK, B. and HÁNA, L.:
The effect of inhibitor-destroying substances on the cofactor and specific antihaemagglutinins against A_2 influenza virus
Acta virol. 5, 194 (1961) a

23. STYK, B. and HÁNA, L.:
Cofactor and specific antibodies against influenza viruses. II: The effect of substances destroying nonspecific inhibitors on the cofactor and on specific antibodies
Acta virol. 5, 343 (1961) b

24. STYK, B.:
Cofactor and specific antibodies against influenza viruses. III: The potentiating effect of cofactor on specific antibodies of early immune and of hyperimmune sera and the difference in the character of these antibodies
Acta virol. 6, 329 (1962)

25. STYK, B.:
Cofactor and specific antibodies against influenza viruses. IV: Some data on the properties of cofactor and its role in serological reactions
Acta virol. 6, 389 (1962)

26. STYK, B. and HÁNA, L.:
Formation of 19S and 7S type viral antibodies; the role and the nature of "antibody cofactor"
Symp. on molecular and cellular basis of antibody formation, Czechoslovak Akad. Sci., Praha 1964

27. STYK, B. and HÁNA, L.:
Cofactor and specific antibodies against influenza viruses. IX: Formation of 19S and 7S type influenza antibodies in white mice. The role of "antibody cofactor"
Acta virol. 9, 109 (1965)

28. TAKÁTSY, G.:
The use of spiral loops in serological and virological micromethods
Acta microbiol. Hung. 3, 191 (1955)

29. TYRRELL, D.A.J.:
Separation of inhibitors of haemagglutination and specific antibodies for influenza viruses by starch zone electrophoresis
J. Immunol. 72, 494 (1954)

30. UHR, J.D., FINKELSTEIN, M.S., and FRANKLIN, E.C.:
Antibody response to bacteriophage ΦX174 in non-mammalian vertebrates
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 111, 13 (1962)

31. YABROV, A.A. and SMORODINTSEV, A.A.:
Basic properties of the Nonspecific Thermolabile Stimulator of Antibodies
Acta virol. 6, 377 (1962)

32. ZAKSTELSKAYA, L.J.:
Virological and immunological observations during the 1957 pandemic. Problems of influenza
Abs. of papers, United sci. Conf. of the Institutes, Kiew 1958, p. 41

33. ZHDANOV, V.M. and STAKHANOVA, V.M.:
Early appearance of thermolabile antibody
Vop. Virusol. 6, 321 (1961)

Für die Überlassung des Themas und die jederzeit freundliche Beratung bei der Ausführung der Arbeit bin ich Herrn Privatdozent Dr. H.-J. Gerth zu besonderem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 17.3.1944 wurde ich, Eckart Schmid, in Saulgau als Sohn des Oberstudienrats Georg Schmid und seiner Frau Elfriede, geb. Unger, geboren. Von 1950 bis 1952 besuchte ich die Volksschule Saulgau und dann die Volksschule und das Gymnasium in Horb a. N., wo ich 1963 die Reifeprüfung ablegte. Seit dem Sommersemester 1963 war ich an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen immatrikuliert. 1965 bestand ich nach 5 vorklinischen Semestern die zahnärztliche Vorprüfung. Am 26. Juli 1968 legte ich nach 5 klinischen Semestern an der Universität Tübingen mein Staatsexamen ab.

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Stuttgart 1, Königstraße 51
Telefon 295681

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Stuttgart 1, Königstraße 51
Telefon 295681